



<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, 5/10, C07K 14/47, 16/18, A61K 48/00, 31/70, 39/395, C12Q 1/02, A01K 67/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/14228</p> <p>(43) 国際公開日 2000年3月16日(16.03.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04789</p> <p>(22) 国際出願日 1999年9月3日(03.09.99)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <p>特願平10/249993 1998年9月3日(03.09.98) JP</p> <p>特願平11/248546 1999年9月2日(02.09.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 科学技術振興事業団(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION)[JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 遠藤 仁(ENDOU, Hitoshi)[JP/JP] 〒229-0022 神奈川県相模原市由野台1-23-7 Kanagawa, (JP) 金井好克(KANAI, Yoshikatsu)[JP/JP] 〒193-0932 東京都八王子市緑町214-102 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 佐伯憲生(SAEKI, Norio) 〒110-0027 東京都中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AU, CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 改訂された国際調査報告書</p> <p>(88) 改訂された国際調査報告書の公開日 : 2000年5月25日(25.05.00)</p> <div data-bbox="971 766 1372 1003" style="text-align: center;"> </div>	
<p>(54) Title: NEUTRAL AMINO ACID TRANSPORTER AND GENE THEREOF</p> <p>(54) 発明の名称 中性アミノ酸トランスポーター及びその遺伝子</p> <p>(57) Abstract</p> <p>g A novel amino acid transporter molecule mediating transportation of amino acids, which are nutrients essentially required in the survival and proliferation of various normal cells constituting a living body and various pathology-associated abnormal cells such as tumor cells, into cells and being expressed specifically in tumor cells compared with normal cells; and drugs for treating various pathogenic conditions such as tumor (cancer) which are obtained by identifying and isolating the above amino acid transporter molecule and identifying a substance capable of inhibiting the biological activity and/or expression of this molecule. Intensive studies were made to identify a tumor cell membrane surface molecule conjugating or interacting with a cell membrane surface 4F2 molecule seemingly playing an important role in the activation of an unknown amino acid transporter. As a result, a gene encoding the novel amino acid transporter molecule, which mediates the incorporation of various neutral amino acids, various drugs or physiological substances into cells, has been found out and a substance capable of inhibiting the incorporation of amino acids via this molecule and thus inhibiting the proliferation of tumor cells has been also found out.</p>		

(57)要約

生体を構成する種々の正常細胞並びに種々の腫瘍細胞などの病態関連異常細胞の生存及び増殖に必須な栄養素であるアミノ酸の細胞内への輸送を媒介するアミノ酸トランスポーター分子であって、特に正常細胞に比べ腫瘍細胞に特異的に発現の見られる新規アミノ酸トランスポーター分子を同定、単離し、該分子の生物活性及び／または該分子の発現を阻害する薬剤を同定することにより、腫瘍（癌）等の種々の病態を治療することができる薬剤を提供する。

未知のアミノ酸トランスポーターの活性化において重要な役割を担うと考えられていた細胞膜表面 4 F 2 分子と共役または相互作用する腫瘍細胞膜表面分子の同定に関して鋭意研究することにより、種々の中性アミノ酸をはじめ、種々の薬剤あるいは生理活性物質の細胞内への取り込みを媒介する新規なアミノ酸トランスポーター分子をコードする遺伝子を見出すとともに、該分子を介したアミノ酸の細胞内への取り込みを阻害し、腫瘍細胞の増殖を阻害する物質を見出した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BJ	ブルキナ・ファソ	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BR	ブラジル	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
CA	カナダ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CG	コンゴ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CI	コートジボワール	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	IL	イスラエル	MX	メキシコ	US	米国
CN	中国	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CR	コスタ・リカ	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ベトナム
CU	キューバ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CY	キプロス	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CZ	チェコ	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
DE	ドイツ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
		KR	韓国				

## 明 細 書

## 中性アミノ酸トランスポーター及びその遺伝子

技術分野

本発明は、アミノ酸輸送タンパク若しくはその一部、該タンパクをコードするDNA若しくはその一部、該タンパクをコードするRNA若しくはその一部、該DNAにハイブリダイズするDNA、該DNAを含む発現ベクター、該DNA若しくは該ベクターで形質転換された形質転換細胞、該RNAが導入された細胞、該タンパク若しくはその一部に反応性を有する抗体若しくはその一部、該抗体を産生する細胞、該DNAの一部を放射性標識してなる標識DNA、該RNAの一部を放射性標識してなる標識RNA、該抗体または該抗体の一部を標識してなる標識抗体、該標識DNAからなるキット、該標識RNAからなるキット、該標識抗体からなるキット、該DNAの一部を含んでなる医薬組成物、該RNAの一部を含んでなる医薬組成物、該抗体若しくは該抗体の一部を含んでなる医薬組成物、該タンパクの発現の有無若しくはその発現量を測定する方法、該タンパクの生物活性を阻害する能力を有する物質の同定方法、該タンパクをコードするDNAのmRNAへの転写を阻害する能力を有する物質の同定方法、該タンパクの発現を阻害する能力を有する物質の同定方法、該同定方法により同定された物質、並びに本発明のタンパクをコードするDNAが導入されたトランスジェニックマウスに関する。

背景技術

アミノ酸は、蛋白質合成の基質となるだけでなく、糖の新生、並びにポリフィリン、プリン及びピリミジンをはじめとする多くの生体分子の生合成における前駆物質となっており極めて重要な役割を担っている。

そのような生合成反応は主に細胞内で行われるため、細胞は、アミノ酸を細胞外から細胞内へ取り込むためのアミノ酸輸送タンパク（アミノ酸トランスポータ

一； amino acid transporter) と総称される種々のタンパクを細胞膜に備えている。

該アミノ酸トランスポーターは、個々の細胞へのアミノ酸の供給のために機能するだけでなく、さらに、組織の中に組み込まれ小腸や腎尿細管におけるアミノ酸の上皮輸送並びに神経組織における神経伝達物質の再吸収を担い、組織の特異的機能発現のための重要な位置に配置されている。

アミノ酸輸送機構（アミノ酸トランスポーターを介したアミノ酸輸送系）については、1960年代頃から培養細胞や細胞膜標本を用いてその同定及び分類がなされ、アミノ酸分子の多様性を反映して、異なった基質特異性を有する種々のアミノ酸トランスポーターを介したアミノ酸輸送系が同定されている（Physiol. Rev., Vol. 70, p. 43-77, 1990）。

しかしながら、それらの輸送系は個々のアミノ酸に対して各々独立して機能するものではなく、各々の分子が複数のアミノ酸を基質とし、該複数のアミノ酸の細胞内輸送を担っている。

アミノ酸は、正の電荷を有する塩基性アミノ酸（ジアミノ／モノカルボン酸）、負の電荷を有する酸性アミノ酸（モノアミノ／ジカルボン酸）並びに中性アミノ酸（モノアミノ／モノカルボン酸または塩基性アミノ酸若しくは酸性アミノ酸以外）に分類される。アミノ酸のこの荷電のため、例えば、中性アミノ酸や負の電荷を有する酸性アミノ酸が、負電位を有する細胞内に濃度勾配に逆らって輸送されるためには、何らかのエネルギー消費と共役した能動輸送を行う必要がある。

このような点から、アミノ酸トランスポーターには、糖輸送系と同様に、ナトリウム ( $\text{Na}^+$ ) 依存性を示すものと、 $\text{Na}^+$ 非依存性を示すものとが存在する。 $\text{Na}^+$ 依存性トランスポーターは、アミノ酸輸送と $\text{Na}^+$ 輸送とを共役させることによりアミノ酸を濃度勾配に逆らって輸送することができるため大きな濃縮能力を有することから、生体内で細胞膜を介した大きな濃度差を形成することが要求される部位で重要な役割を果たしている（Annual Rev. 腎臓，「腎特異的有機溶質トランスポーターの構造と機能」，p. 91-100, 1995, 中外医学社発行）。このよ



うな  $\text{Na}^+$  依存性トランスポーターは、さらに2種類のファミリー、即ち、 $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  依存性トランスポーターファミリーと  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  依存性トランスポーターファミリーに大別することができる (Annual Rev. Neurosci., Vol. 16, p. 73-93, 1993 及び FASEB J., Vol. 7, p. 1450-1459, 1993)。

また、アミノ酸トランスポーターは、そのような荷電の性質と合わせて、その基質特異性の点で、塩基性アミノ酸 (ジアミノ/モノカルボン酸) を基質とする分子、酸性アミノ酸 (モノアミノ/ジカルボン酸) を基質とする分子、及び中性アミノ酸 (モノアミノ/モノカルボン酸または塩基性アミノ酸若しくは酸性アミノ酸以外) を基質とする分子に分類することができる。

例えば、アルギニン、リジン及びヒスチジン (中性に近い塩基性アミノ酸) などのように側鎖にアミノ基やイミダゾール基を有する塩基性アミノ酸は、主に  $\text{Na}^+$  非依存性アミノ酸トランスポーター  $y^+$  によって輸送されることが知られている (J. Membrane Biol., Vol. 66, p. 213-225, 1982)。グルタミン酸やアスパラギン酸のように側鎖にカルボキシル基を有する酸性アミノ酸は、 $\text{Na}^+$  依存性アミノ酸トランスポーター  $X^{\text{Na}, \text{Cl}}$  によって輸送されることが知られている (Biochim. Biophys. Acta, Vol. 732, p. 24-31, 1983)。また、多くのアミノ酸が属する中性アミノ酸の輸送では、 $\text{Na}^+$  非依存性アミノ酸トランスポーター  $L$  (Ann. Rev. Physiol., Vol. 46, p. 417-433, 1984)、 $\text{Na}^+$  依存性アミノ酸トランスポーター  $A$  及び  $ASC$  (Ann. Rev. Physiol., Vol. 46, p. 417-433, 1984 並びに J. Membrane Biol., Vol. 52, p. 83-92, 1980) が重要な役割を担うことが知られている (Physiol. Rev., Vol. 70, p. 43-77, 1990 並びに 最新医学, Vol. 50, p. 1997-2004, 1995)。

前述のとおり、アミノ酸は、細胞内で行われる種々の生体成分の生合成における原料として極めて重要な役割を有していることから、このアミノ酸の細胞内への輸送の異常は、種々の病態に関与していると推察することができる。

これまでの研究から、アミノ酸の細胞内への輸送機構の異常が関与する病態としては、腎尿細管からのアミノ酸再吸収の障害が出るアミノ酸尿症や、グルタミ

ン酸取り込み障害と神経細胞死が関与する筋萎縮性側索硬化症などが知られている (Annual Rev. 腎臓, 「腎特異的有機溶質トランスポーターの構造と機能」, p. 91-100, 1995, 中外医学社発行; 最新医学, Vol. 50, p. 1997-2004, 1995; 並びに 最新医学, Vol. 51, p. 64-70, 1996)。

アミノ酸トランスポーターは、あらゆる細胞の発生、分化、増殖及び維持に必要なアミノ酸の取り込みに必須且つ極めて重要な役割を担うことから、上述のような病態だけでなくさらに多くの病態の発症において関係するものと考えられる。また、アミノ酸トランスポーターの生体における必須性を考えると、種々のアミノ酸の取り込みが、これまでに同定された幾つかのトランスポーターのみで媒介されているとは考えにくく、さらに多くの未知のアミノ酸トランスポーターが存在するものと考えられる。

そのような細胞、組織及び臓器、ひいては生体の生存及び維持に必須な役割を担う未知のアミノ酸トランスポーターを同定することは、未だ原因が解明されていない種々疾患の発症の原因を解明できる可能性を有する。さらに該アミノ酸トランスポーターと種々疾患との関連性が解明されれば、該アミノ酸トランスポーターの生物学的機能あるいは発現を調節することにより、該疾患の有効な治療を行うことが可能となるものと考えられることから、新たなアミノ酸トランスポーターの同定し、該トランスポーター分子と病態との関連性を解明することが急務となっている。

しかしながら、このような医学的並びに社会的ニーズにも拘らず、アミノ酸トランスポーターの同定並びにアミノ酸輸送機構の解明は未だあまり進んでいないのが現状である。

即ち、アミノ酸トランスポーター分子を同定するためには、該分子の精製する必要があるとともに、該精製物の活性を解析するために、該精製物を細胞膜に再構成させアミノ酸輸送活性を再現する必要がある。しかしながら、アミノ酸トランスポーター分子は、膜蛋白としての発現量が相対的に少ない上に、活性の再現効率も十分ではないことから、新たな分子の同定における技術上の困難性が存在する。

また、例えば、癌細胞（腫瘍細胞）のような病態に直接関係する非正常細胞（異常細胞）に特異的に発現し、該異常細胞へのアミノ酸の供給を担うようなアミノ酸トランスポーターを同定することは、そのような病態関連細胞の生存及び増殖のメカニズムの解明、並びに癌などの疾患の治療方法の開発において極めて重要な意義を有するが、アミノ酸トランスポーターは、もともと正常な細胞の生存に必須の分子であり幅広い細胞種に存在すると考えられることから、そのような異常細胞特異的に発現するアミノ酸トランスポーター分子を同定することは容易なことではない。

中性アミノ酸トランスポーターとしては、ナトリウム依存的なトランスポーターとして、ASCT1およびASCT2がクローニングされている（Kanai, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9, 565 (1997)）。しかし、これらは、アラニン、セリン、システイン、スレオニン、グルタミンを主な基質とするものであり、中性アミノ酸輸送系Lとは基質選択性が異なっている。また、グリシントランスポーターとプロリントランスポーターがクローニングされているが、中性アミノ酸輸送系Lとは基質選択性が異なる。（Amara and Kuhar, *Annu. Rev. Neurosci.*, 16, 73 (1993)）。

トランスポーター自体ではないが、アミノ酸トランスポーターの活性化因子であると考えられている膜貫通構造を一回しか持たない二型膜糖タンパク質であるrBAT及び4F2hcのcDNAがクローニングされており、それらをアフリカツメガエル卵母細胞で発現させると中性アミノ酸とともに塩基性アミノ酸の取り込みを活性化することが知られている（Palacin, *J. Exp. Biol.*, 196, 123 (1994)）。

従って、そのような病態に深く関連する異常細胞に特異的に発現の見られる未だ同定されていないアミノ酸トランスポーター分子を同定し、該分子と該異常細胞の生存及び増殖との関連性を解明することは、該病態及び疾患の治療方法を提供するための有効な手がかりとなる。

即ち、該アミノ酸トランスポーター分子の生物活性、または該分子の発現を制御することにより、該疾患を治療することが可能である。

本発明者らは、そのような病態関連異常細胞、特に腫瘍細胞に特異的に発現が見られる新規アミノ酸トランスポーターの探索を行うために、腫瘍細胞の増殖に必須と考えられている既知の細胞膜表面分子 4 F 2 (C D 9 8) に注目することにより正常細胞での発現に比べ腫瘍細胞に特に有意に発現の見られる L A T 1 (L-type amino acid transporter-1) と命名した新規アミノ酸トランスポーター分子を同定することに成功した。

即ち、腫瘍細胞は、急速に細胞分裂し、継続的に成長、増殖するためには、アミノ酸や糖などの栄養素が細胞内に供給される必要があり、この供給は、該栄養素に特異的なアミノ酸トランスポーターのアップレギュレーションにより担われていると考えられる (Physiol. Rev., Vol. 70, p. 43-77, 1990)。腫瘍細胞の成長、増殖及び維持のためには細胞内で蛋白合成が行われる必要があるため、必須アミノ酸の細胞内への取り込み (細胞外から細胞内への輸送) は特に重要である。

これまでの研究から、腫瘍細胞の増殖には、未だ同定されていないアミノ酸トランスポーターを活性化する機能を有すると考えられるタイプ II 膜糖タンパクに分類される 4 F 2 (C D 9 8) と命名された既知の細胞膜表面抗原が重要な役割を担うのではないかと考えられてきた (J. Immunol., Vol. 126, p. 1409-1414, 1981; J. Immunol., Vol. 129, p. 623-628, 1982; Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 84, p. 6526-6530, 1987; Cancer Res., Vol. 46, p. 1478-1484, 1986; J. Biol. Chem., Vol. 267, p. 15285-15288, 1992; Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 89, p. 5606-5610, 1992; Biochem. J., Vol. 324, p. 535-541, 1997; 及び J. Exp. Biol., Vol. 196, p. 123-137, 1994)。

そこで、本発明者らは、4 F 2 分子と共役または相互作用するヒト腫瘍細胞膜表面分子の同定に関して鋭意研究した結果、下記のような特徴を有する新規なアミノ酸トランスポーター L A T 1 をコードする遺伝子を見出し本発明を完成するに到った。

#### 発明の開示

本発明に係るアミノ酸トランスポーター L A T 1 は、とりわけヒト由来アミノ

酸トランスポーターLAT1はの下記のような特徴を有する。

(1) ヒト由来の腫瘍細胞及びヒト正常組織由来のmRNAを用いたノーザンブロットイング (Northern Blotting) により、胃印環細胞癌細胞株 (stomach signet ring cell carcinoma (KATOIII))、黒色腫細胞株 (malignant melanoma (G-361)) 及び肺小細胞癌細胞株 (lung small cell carcinoma (RERF-LC-MA)) をはじめとする幅広い範囲のヒト由来腫瘍細胞に約4.8kbのバンドとしてその発現が見られる。また、ヒト正常組織においては、細胞の新生と増殖が激しい特定の限られた組織 (胎盤、胎児肝臓、骨髄、精巣、脳、及び末梢血白血球) においてのみ同様に約4.8kbのバンドとして発現が確認される。

(2) オープンリーディングフレーム (ORF、終始コドンを含む) は、1,524個の塩基からなる塩基配列を有し (配列番号1に記載の塩基配列の塩基番号66乃至1589番目の塩基配列)、該ORFは、全体として507個のアミノ酸から構成されるアミノ酸配列をコードし、約55kDa (計算値) の分子量を有する (配列番号2)。

(3) 疎水性プロット分析により、ヒトLAT1は、1.2個の膜貫通領域を有し、細胞内領域に、チロシンプロテインキナーゼによるリン酸化部位 (配列番号2のアミノ酸配列の119番目のTyr) 並びにプロテインキナーゼCによるリン酸化部位 (配列番号2のアミノ酸配列の189番目のSer及び346番目のSer) を有する膜表面分子であると同定される。

(4) ヒトLAT1とヒト4F2hc (4F2 heavy chain) を共発現させた細胞において、中性アミノ酸であるロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)、フェニルアラニン (Phe)、メチオニン (Met)、チロシン (Tyr)、トリプトファン (Trp) 及びバリン (Val)、並びに中性に近い塩基性アミノ酸であるヒスチジン (His) の極めて強い取り込みが確認される。また、他の中性アミノ酸であるスレオニン、システイン、アスパラギン及びグルタミンの有意な取り込みが確認される。

(5) ヒトLAT1とヒト4F2hcとの共発現させた細胞においては、前述のアミノ酸の取り込みだけでなく、パーキンソン治療薬であるL-DOPAなどの既知の薬剤、並びにトリヨードサイロニン (甲状腺ホルモン) 等の生理活性物質の取り込みが確認される。さらに、中性アミノ酸取り込み阻害薬として知られ

る B C H (2-amino-2-norbornane-carboxylic acid) の取り込みも確認される。

(6) ミカエリス—メンテン動力学試験において、ヒト L A T 1 と前述のような種々の基質との親和性を表す K m 値は約  $2.1 \mu\text{M}$  である。

(7) 前述の L A T 1 を介する種々アミノ酸、薬剤及び生理活性物質の細胞内への取り込みは、 $\text{Na}^+$  イオンや  $\text{Cl}^-$  イオンには依存しない。

即ち、本発明は、正常細胞に比べ、幅広い範囲の腫瘍細胞に特異的な発現が見られ、且つ幅広い基質特異性を有する種々の腫瘍細胞の生存及び増殖において必須であると考えられるアミノ酸トランスポーターを世界で初めて開示するものである。

本発明のアミノ酸トランスポーター分子の上述のような特徴から、該分子は、例えば抗腫瘍薬（抗癌剤）の開発におけるターゲットとして極めて有望である。即ち、該分子の生物活性あるいは該分子の発現を抑制する活性を有する薬剤（アンチセンス DNA 医薬品、アンチセンス RNA 医薬品、抗体医薬品、抗体フラグメント医薬品、あるいはペプチドアンタゴニスト医薬品、低分子化合物等の非ペプチドアンタゴニスト医薬品など）を用いて、該分子を介した栄養素（種々のアミノ酸や生理活性物質）の腫瘍細胞内への取り込みを阻害することにより、腫瘍細胞を飢餓状態とし腫瘍細胞の生存及び増殖を阻害することが可能である。

従って、本発明のタンパク若しくはその一部、該タンパクをコードする DNA 若しくはその一部、該タンパクをコードする RNA 若しくはその一部、該 DNA にハイブリダイズする DNA、該 DNA を含む発現ベクター、該 DNA 若しくは該ベクターで形質転換された形質転換細胞、該 RNA が導入された細胞、該タンパク若しくはその一部に反応性を有する抗体若しくはその一部、該抗体を産生する細胞、該 DNA の一部を放射性標識してなる標識 DNA、該 RNA の一部を放射性標識してなる標識 RNA、該抗体または該抗体の一部を標識してなる標識抗体、該標識 DNA からなるキット、該標識 RNA からなるキット、並びに該標識抗体からなるキットは、そのような抗腫瘍効果を有する薬剤として、及び／またはそのような薬剤開発における試薬として極めて有用である。

また、上記のような本発明の DNA、RNA あるいは形質転換細胞等の種々の物質を用いることにより、そのような種々の薬剤を同定するための種々の方法

(あるいはアッセイ方法)を提供することが可能である。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、ヒトアミノ酸トランスポーターLAT1とラットアミノ酸トランスポーターLAT1の各々のアミノ酸配列の相同性を示す図である。

第2図は、疎水性プロット分析によるヒトアミノ酸トランスポーターLAT1の親水性及び疎水性領域を示す図である。

第3図は、ノーザンブロッティングによる種々のヒト組織でのヒトアミノ酸トランスポーターLAT1のmRNAの発現状態を示す図である。。

第4図は、ヒトアミノ酸トランスポーターLAT1及びヒト細胞膜表面分子4F2hcを共発現させたアフリカツメガエル卵母細胞での細胞内へのロイシンの取り込み活性を示す図である。

第5図は、ヒトアミノ酸トランスポーターLAT1及びヒト細胞膜表面分子4F2hcを共発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を種々の塩の存在下で培養した場合の細胞内へのロイシンの取り込み量を示す図である。

第6図は、ミカエリス・メンテン動力学試験によるヒトアミノ酸トランスポーターLAT1の基質に対する親和性を示す図である。

第7図は、ヒトアミノ酸トランスポーターLAT1及びヒト細胞膜表面分子4F2hcを共発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を種々のアミノ酸の存在下で培養した場合の、基質としての放射性標識ロイシンの細胞内への取り込み量を示す図である。

第8図は、ヒトアミノ酸トランスポーターLAT1及びヒト細胞膜表面分子4F2hcを共発現させたアフリカツメガエル卵母細胞をアミノ酸または薬剤の存在下で培養した場合の、基質としての放射性標識フェニルアラニンの細胞内への取り込み量を示す図である。

第9図は、ヒトアミノ酸トランスポーターLAT1及びヒト細胞膜表面分子4F2hcを共発現させたアフリカツメガエル卵母細胞をアミノ酸または生理活性物質の存在下で培養した場合の、基質としての放射性標識ロイシンの細胞内への取り込み量を示す図である。

第10図は、ヒトアミノ酸トランスポーターLAT1及びヒト細胞膜表面分子4F2hcを共発現させたアフリカツメガエル卵母細胞への、基質としての種々の放射性標識アミノ酸の細胞内への取り込み量を示す図である。

第11図は、ラットC6グリオーマ由来mRNA及び／又はラット4F2hc遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞によるロイシン取り込み実験の結果を示す図である。

第12図は、ラット中性アミノ酸トランスポーターLAT1の疎水性プロットを示す図である。

第13図は、ラットの各臓器組織におけるLAT1遺伝子mRNAの発現をノーザンブロッティングにより解析した結果を示した図面に代わる写真である。

第14図は、ラットの各培養細胞株におけるLAT1遺伝子mRNAの発現とラット肝臓におけるLAT1遺伝子mRNAの発現をノーザンブロッティングにより比較した結果を示した図面に代わる写真である。

第15図は、ヒトの各培養細胞株におけるLAT1遺伝子mRNAの発現をノーザンブロッティングにより解析した結果を示した図面に代わる写真である。

第16図は、ラットLAT1遺伝子のcRNA及び／又はラット4F2hc遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞によるロイシン取り込み実験をcRNA注入後2日又は5日で行った結果を示す図である。

第17図は、ラットLAT1遺伝子のcRNA及びラット4F2hc遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞によるロイシン取り込み実験において添加する塩の影響を調べた結果を示す図である。

第18図は、ラットLAT1遺伝子のcRNA及びラット4F2hc遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞によるロイシン取り込み実験において基質ロイシンの濃度の影響を調べた結果を示す図である。

第19図は、ラットLAT1遺伝子のcRNA及びラット4F2hc遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞によるロイシン取り込み実験において、系への各種アミノ酸もしくはその類似化合物添加の影響を調べた結果を示す図である。

第20図は、培養ラット肝細胞株において、培地へのD-ロイシン又はBCH添加の細胞増殖への影響を調べた結果を示す図である。



第21図は、ヒト培養腫瘍細胞株におけるLAT1遺伝子mRNA及び4F2hc遺伝子mRNAの発現をノーザンブロッティングにより解析した結果を示した図面に代わる写真である。

第22図は、ヒト培養腫瘍細胞株（白血病細胞）におけるLAT1遺伝子mRNA及び4F2hc遺伝子mRNAの発現をノーザンブロッティングにより解析した結果を示した図面に代わる写真である。

第23図は、T24細胞のロイシン取り込みのNa<sup>+</sup>依存性を調べた結果を示す図である。

第24図は、上：T24細胞のロイシン取り込みの濃度依存性（Michaelis-Menten動力学試験）を示した図。下：T24細胞のロイシン取り込みの濃度依存性のEadie-Hoffstee plotによる解析の結果を示した図である。

第25図は、T24細胞によるロイシン取り込み実験において、系への各種アミノ酸もしくはその類似化合物添加の影響を調べた結果を示す図である。

第26図は、T24細胞によるロイシン取り込み実験において、BCHの効果を用いて解析した結果を示す図である。

第27図は、T24細胞（A）とDaudi細胞（B）の増殖に対するBCHの効果を示した図である。

第28図は、ICRマウスにマウスsarcoma180細胞を腹腔内移植し、BCH、D-Leu及びD-Alaの延命効果を検討した結果を示す図である。

#### 発明を実施する最良の形態

本願における種々の発明は、具体的には、各々下記のような有用性を有する。

本発明のDNA、RNA及び形質転換細胞は、遺伝子組換え技術を用いて本発明のタンパクを組換えタンパクとして製造することにおいて有用であるのみならず、本発明タンパクの生物活性を制御する（活性化、抑制、阻害）薬剤、本発明のタンパクのmRNAへの転写を阻害する薬剤、該mRNAから本発明のタンパクへの翻訳を阻害する薬剤、あるいは該タンパクの他の分子との相互作用を阻害する薬剤などの薬剤設計、スクリーニング、並びに同定のための試薬（ツール）として極めて有用である。

具体的には、本発明のDNAは、本発明のタンパクの生物活性を制御する薬剤の同定のためのアッセイだけでなく、並びに本発明のタンパクの発現を調節する薬剤の同定のためのアッセイにも用いることができる。

前者のアッセイは、該本発明のアミノ酸トランスポーター分子をコードするDNAで哺乳動物等の細胞を形質転換することにより細胞に該分子を発現させ、該形質転換細胞を、被験物質と該分子の基質（アミノ酸等）との共存下で培養することにより、細胞内に取り込まれる基質の量を対照細胞での取り込みと比較することにより本発明のアミノ酸トランスポーターの生物活性の制御に対する該被験物質の活性を評価するものである。

後者のアッセイは、そのような薬剤のアッセイ、スクリーニング及び同定において慣用される所謂レポータージーンアッセイ（reporter gene assay）並びに該レポータージーンアッセイを原理としスクリーニングを機械（ロボット）を用いて自動で行う所謂ハイスループットスクリーニング（High Throughput Screening）（組織培養工学、Vol. 23, No. 13, p. 521-524；米国特許第5,670,113号）に代表される。

本発明においては、本発明のアミノ酸トランスポーター分子をコードするDNA、該DNAの発現調節制御領域をコードするDNA、及びルシフェラーゼなどの蛍光を発するレポータータンパク分子をコードするDNAを、該トランスポーター分子の発現に依存して該レポータータンパク分子が発現可能なように挿入した発現ベクターで、遺伝子組換えタンパクの製造で一般的に使用される細胞を形質転換することによって得られた形質転換細胞に、被験化合物を接触させ、該化合物の作用に依存して発現されるトランスポーター分子の量を、該分子の発現と同時に発現される該レポータータンパクが発する蛍光の量を測定することにより間接的に測定することにより、該化合物が、トランスポーター分子の発現に影響を与えるか否かを分析することができる（米国特許第5,436,128号；米国特許第5,401,629号）。

また、本発明のRNAの場合には、本発明のアミノ酸トランスポータータンパク分子の生物活性を制御する薬剤の同定のためのアッセイにおいて用いることが

できる。

本アッセイは即ち、本発明のアミノ酸トランスポーター分子をコードするRNAを、例えばアフリカツメガエルの卵母細胞に注入することにより該細胞に該トランスポーター分子を発現させ、被験物質と該分子の基質（アミノ酸等）との共存下で培養することにより、細胞内に取り込まれる基質の量を対照細胞での取り込みと比較することにより本発明のアミノ酸トランスポーターの生物活性の制御に対する該被験物質の活性を評価するものである。

本発明のDNAの一部並びにRNAの一部は、コロニーハイブリダイゼーション法あるいはブラークハイブリダイゼーション法を用いてそれらとハイブリダイズするDNAあるいはRNAを同定する場合のプロブとして用いることができる。さらに、本発明のDNAの一部は、PCR法（Polymerase-chain reaction）を用いて本発明のDNAあるいは本発明のトランスポーター分子をコードする遺伝子を増幅するためのプライマーとして用いることができる。

さらに、本発明のDNAの一部、該DNAに相補的なDNA、あるいは本発明のRNAの一部は、前述の試薬としての有用性のみならず、いわゆるアンチセンスDNA医薬あるいはアンチセンスRNA医薬として有用である。

即ち、アンチセンス医薬とは、DNAの塩基配列の一部、該DNAの塩基配列に相補的な塩基配列の一部、あるいはRNAの塩基配列の一部が、各々が有する塩基配列と相補的な配列を有するDNAまたはRNAに結合する性質を利用して、DNAからmRNAへの転写または該mRNAからタンパクへの翻訳を阻害するメカニズムによる薬剤である。このアンチセンス医薬は、該アンチセンス配列の一部を化学修飾することにより、血中での半減期の増大、細胞内への透過性あるいは疾患標的部位へのターゲッティング効率等の性質を改変することが可能である。

本発明のタンパクは、該タンパク分子が細胞表面上に発現させた状態を利用することにより、前述したように、本発明のタンパクの生物活性または該タンパクの発現を制御する薬剤の同定を行うことができる。また、該タンパクのアミノ酸

配列を基に、該タンパクの生物活性を阻害する能力を有するペプチドアンタゴニストを設計することができる。このように設計されたペプチドアンタゴニストは、本発明のタンパクであるアミノ酸トランスポーターの種々の基質との結合、あるいは本発明のタンパクの他の分子との結合を競合的に阻害することにより、本発明のタンパクの生物学的機能が発揮されないようにする医薬品として有用である。

本発明のタンパク及びその一部並びに該タンパクを発現する形質転換細胞等の細胞は、本発明のタンパクに対する抗体（抗血清、モノクローナル抗体）の作成における免疫感作抗原として有用である。

本発明のタンパクであるアミノ酸トランスポーター分子に反応性を有する抗血清（ポリクローナル抗体）並びにモノクローナル抗体は、該分子に結合することにより該分子の生物活性の発揮を阻害（中和）することによる抗体医薬品として有用である。

さらに、該抗体は、検出可能なシグナルをもららすことができる種々の物質で標識することにより、種々の生体試料（細胞、組織、臓器あるいは体液など）での本発明のタンパクの発現状態の分析（免疫組織染色、ウェスタンブロット、ELISAなど）における試薬として有用である。

このような標識抗体と同様に、本発明のDNAまたはその一部を検出可能なシグナルをもたらすことができる種々の物質で標識した標識DNAは、本発明のタンパクをコードする遺伝子の同定における試験（例えば、サザンブロッティング、FISHなど）における試薬として有用である。

また、同様に発明のRNAまたはその一部を、放射性同位体で標識した放射性標識RNAは、細胞、組織あるいは臓器における本発明のタンパクをコードするmRNAの発現状態の分析（ノーザンブロッティングなど）における試薬として有用である。

また、本発明のDNAについては、例えば、本発明の態様の1つであるヒト由来のアミノ酸トランスポーターのDNAをマウス等のヒト以外の哺乳動物に導入

することによりモデル動物としてのトランスジェニック動物を作製することができる。

さらに、該本発明のヒト由来のアミノ酸トランスポーターをコードする遺伝子をプローブとして用いてウサギあるいはマウス由来のホモログタンパクをコードする遺伝子をクローニングし、選られた遺伝子情報をもとに、マウスやウサギの該ホモログタンパクをコードする内在性遺伝子を破壊（不活性化）することによりモデル動物（ノックアウト動物）を作成することが可能である。これらのモデル動物の物理学的、生物学的、病理学的及び遺伝子的特徴を分析することにより、本発明に係るアミノ酸トランスポーターの機能をさらに詳細に解明することが可能となる。

さらに、そのようにして内在性遺伝子が破壊された該モデル動物と該トランスジェニック動物を交配することにより、本発明のヒト由来アミノ酸トランスポーターをコードする遺伝子（DNA）のみを有するモデル動物を作成することが可能である。このモデル動物に、前述した本発明のアミノ酸トランスポーター分子の生物活性あるいは該分子の発現を制御する薬剤（アンチセンス医薬、ペプチドアンタゴニスト、低分子非ペプチド化合物、抗体等）を投与することにより、その薬剤の治療学的効果を評価することが可能となる。

本発明は、即ち、上述のような産業上極めて高い有用性を有する下記<1>乃至<55>に各々記載した物質、医薬、試薬並びに方法を提供するものである。

<1> アミノ酸の細胞内への輸送を媒介する能力を有する細胞表面タンパクであって、ロイシン（Leu）、イソロイシン（Ile）、フェニルアラニン（Phe）、メチオニン（Met）、チロシン（Tyr）、トリプトファン（Trp）、バリン（Val）及びヒスチジン（His）からなる群から選ばれる少なくとも1種類のアミノ酸の細胞内への取り込みを $\text{Na}^+$ 非依存性で媒介する能力を有するタンパク。

<2> タイプII膜糖タンパクに分類される4F2タンパク又はその一部と共存したとき、中性アミノ酸及びその類似物質を輸送する能力を有するタンパクである<1>に記載のタンパク。

< 3 > タイプII膜糖タンパクに分類される4F2タンパクが、配列番号6若しくは8に記載のアミノ酸配列、又は、その一部のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するタンパクである < 2 >に記載のタンパク。

< 4 > ヒト又はラット由来のタンパクである< 1 >~< 3 >のいずれかに記載のタンパク。

< 5 > 下記(1)または(2)のいずれかのアミノ酸配列を有する< 1 >~< 4 >のいずれかに記載のタンパク。

(1) 配列番号2若しくは4に記載のアミノ酸配列；または

(2) 配列番号2若しくは4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列。

< 6 > 配列番号2又は4に記載のアミノ酸配列中の部分アミノ酸配列を含み、抗原性を有するポリペプチド。

< 7 > < 1 >~< 5 >のいずれかに記載のタンパクをコードするDNA。

< 8 > ヒト又はラット由来のDNAである< 7 >に記載のDNA。

< 9 > 配列番号1に記載の塩基配列の塩基番号66乃至1586の塩基配列、又は配列番号3に記載の塩基配列の塩基番号64乃至1599の塩基配列を有するDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、少なくとも1種類のアミノ酸の細胞内への取り込みを媒介する能力を有する細胞表面タンパクをコードするDNA。

< 10 > アミノ酸の細胞内への取り込みが、タイプII膜糖タンパクに分類される4F2タンパク又はその一部と共存下において媒介される細胞表面タンパクをコードする< 9 >に記載のDNA。

< 11 > タイプII膜糖タンパクに分類される4F2タンパクが、配列番号6若しくは8に記載のアミノ酸配列、又は、その一部のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するタンパクである< 10 >に記載のDNA。

< 12 > < 7 >~< 11 >に記載のDNAから誘導され得るRNA。

< 13 > RNAが配列番号26又は27に記載の塩基配列を有するRNAである< 12 >に記載のRNA。

< 14 > 前記< 7 >乃至前記< 11 >のいずれかに記載のDNAを含む発現

ベクター。

< 1 5 > 前記< 1 4 >に記載の発現ベクターで形質転換された形質転換細胞。

< 1 6 > 該形質転換細胞が、さらに配列番号 5 に記載の塩基配列の塩基番号 1 1 0 乃至 1 6 9 6 の塩基配列及び該塩基番号 1 6 9 6 の塩基に隣接する T A G、T G A 若しくは T A A で表されるいずれか 1 つのナンセンス塩基配列からなる塩基配列を含む D N A で形質転換されていることを特徴とする前記< 1 4 >又は< 1 5 >に記載の形質転換細胞。

< 1 7 > 該形質転換細胞が、さらにレポータータンパクをコードする D N A により形質転換されていることを特徴とする前記< 1 4 >～< 1 6 >のいずれかに記載の形質転換細胞。

< 1 8 > 前記< 1 2 >又は< 1 3 >に記載の R N A が導入されていることを特徴とする非ヒト由来の細胞。

< 1 9 > 該細胞が、アフリカツメガエルの卵母細胞であることを特徴とする前記< 1 8 >に記載の細胞。

< 2 0 > 前記< 1 >～< 5 >のいずれかに記載のタンパクまたは前記< 6 >に記載のポリペプチドに反応性を有する抗血清またはポリクローナル抗体。

< 2 1 > 前記< 1 >～< 5 >のいずれかに記載のタンパクまたは前記< 6 >に記載のポリペプチドに反応性を有するモノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部。

< 2 2 > 当該モノクローナル抗体が、ヒト以外の哺乳動物由来のイムノグロブリンの可変領域、及びヒト由来のイムノグロブリンの定常領域とからなる組換えキメラモノクローナル抗体であることを特徴とする前記< 2 1 >に記載のモノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部。

< 2 3 > 当該モノクローナル抗体が、ヒト以外の哺乳動物由来のイムノグロブリンの超可変領域の相補性決定領域の一部または全部、ヒト由来のイムノグロブリンの超可変領域の枠組領域、及びヒト由来のイムノグロブリンの定常領域とからなる組換えヒト型モノクローナル抗体であることを特徴とする前記< 2 1 >に記載のモノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部。

< 2 4 > 当該モノクローナル抗体が、ヒトモノクローナル抗体であることを

特徴とする前記< 2 1 > ~ < 2 3 > のいずれかに記載のモノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部。

< 2 5 > 前記< 2 1 > ~ < 2 4 > のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生する細胞。

< 2 6 > 該細胞が、該モノクローナル抗体を産生する能力を有する非ヒト哺乳動物由来の B 細胞と哺乳動物由来のミエローマ細胞とを融合して得られる融合細胞であることを特徴とする前記< 2 5 > に記載の細胞。

< 2 7 > 該細胞が、該モノクローナル抗体の重鎖をコードする DNA 若しくはその軽鎖をコードする DNA のいずれか一方の DNA、または両方の DNA が細胞内に導入されることにより形質転換された遺伝子組換え細胞であることを特徴とする前記< 2 5 > に記載の細胞。

< 2 8 > 前記< 7 > ~ < 1 1 > のいずれかに記載の DNA 及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

< 2 9 > 該医薬組成物が、腫瘍細胞の増殖を抑制するために用いられることを特徴とする前記< 2 8 > に記載の医薬組成物。

< 3 0 > 前記< 1 2 > 又は< 1 3 > に記載の RNA 及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

< 3 1 > 該医薬組成物が、腫瘍細胞の増殖を抑制するために用いられることを特徴とする前記< 3 0 > に記載の医薬組成物。

< 3 2 > 前記< 2 0 > に記載の抗血清若しくはポリクローナル抗体、及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

< 3 3 > 該医薬組成物が、腫瘍細胞の増殖を抑制するために用いられることを特徴とする前記< 3 2 > に記載の医薬組成物。

< 3 4 > 前記< 2 1 > ~ < 2 4 > のいずれかに記載のモノクローナル抗体若しくは該モノクローナル抗体の一部、及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

< 3 5 > 該医薬組成物が、腫瘍細胞の増殖を抑制するために用いられることを特徴とする前記< 3 4 > に記載の医薬組成物。

< 3 6 > 前記< 2 1 > ~ < 2 4 > のいずれかに記載のモノクローナル抗体を、



単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識してなる標識モノクローナル抗体。

< 3 7 > 標識物質が、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジン、または放射性同位体であることを特徴とする前記< 3 6 >に記載の標識モノクローナル抗体。

< 3 8 > 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパクまたはその断片を検出するためのキットであって、前記< 3 6 >または前記< 3 7 >に記載の標識モノクローナル抗体からなることを特徴とするキット。

< 3 9 > 試料中のタンパクの発現の有無または発現量を調べる方法であって、

(1) 試料に前記< 3 6 >または< 3 7 >に記載の標識モノクローナル抗体を接触させる工程；及び

(2) 該試料に結合した該標識モノクローナル抗体の量を、該標識モノクローナル抗体に結合している標識物質の種類に応じて、蛍光、化学発光若しくは放射活性を検出することにより測定する工程、

を含むことを特徴とする方法。

< 4 0 > 試料が、腫瘍細胞、腫瘍組織または腫瘍を有する臓器若しくはその一部であることを特徴とする前記< 3 9 >に記載の方法。

< 4 1 > 前記< 7 >～< 1 1 >のいずれかに記載の DNA 又はその断片を、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジンまたは放射性同位体で標識してなる標識 DNA。

< 4 2 > 前記< 1 2 >または前記< 1 3 >に記載の RNA を放射性同位体で標識してなる放射性標識 RNA。

< 4 3 > 前記< 1 >～< 5 >のいずれかに記載のタンパクをコードする遺伝子を検出するためのキットであって、前記< 4 1 >に記載の標識 DNA または前記< 4 2 >に記載の放射性 RNA からなることを特徴とするキット。より詳細には、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパクをコードする遺伝子を検出するためのキットであって、前記< 4 1 >に記載の放射性 DNA または前記< 4 2 >に記載の放射性 RNA からなることを特徴とするキット。

< 4 4 > 前記< 1 >～< 5 >のいずれかに記載のタンパクを用いて、当該タ

ンパクの有する中性アミノ酸類を輸送する能力に対する被検物質の基質としての作用を検出する方法。

<45> 前記<7>~<11>のいずれかに記載のDNAで形質転換された細胞を用いる前記<44>に記載の方法。

<46> アフリカツメガエルの卵母細胞を用いる前記<44>に記載の方法。

<47> 被検物質が、アミノ酸以外の物質である前記<44>44~<46>のいずれかに記載の方法。

<48> 前記<1>~<5>のいずれかに記載のタンパクを用いて、当該タンパクの有する中性アミノ酸及びその類似物質を輸送する能力を阻害する作用を有する被検物質をスクリーニングする方法。より詳細には、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパクの生物学的機能であって、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)、フェニルアラニン (Phe)、メチオニン (Met)、チロシン (Tyr)、ヒスチジン (His)、トリプトファン (Trp)及びバリン (Val)からなる群から選ばれるいずれか1種類のアミノ酸の細胞内への取り込みを媒介する能力を阻害する能力を有する物質を同定する方法であって、該方法が、下記(1)並びに(2)の工程を含むことを特徴とする方法：

(1) 下記(a)乃至(d)のいずれかの細胞を、該物質、並びにロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)、フェニルアラニン (Phe)、メチオニン (Met)、チロシン (Tyr)、ヒスチジン (His)、トリプトファン (Trp)及びバリン (Val)からなる群から選ばれるいずれか1種類のアミノ酸を放射性同位体により標識してなる放射性標識アミノ酸との共存下、または該放射性標識アミノ酸のみの存在下で培養する工程：

(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク及び配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するタンパクを共発現している天然に存在する細胞；

(b) 配列番号1に記載の塩基配列の塩基番号66乃至1586の塩基配列及び該塩基番号1586の塩基に隣接するTAG、TGA若しくはTAAで表されるいずれか1つのナンセンス塩基配列からなる塩基配列を含むDNA、並びに配列番号5に記載の塩基配列の塩基番号110乃至1696の塩基配列及び該塩基番号1696の塩基に隣接するTAG、TGA若しくはTAAで表されるい

いずれか 1 つのナンセンス塩基配列からなる塩基配列を含む DNA で共形質転換することにより、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク及び配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するタンパクを共発現している組換え細胞；

(c) 配列番号 26 に記載の塩基配列の塩基番号 1 乃至 1521 の塩基配列及び該塩基番号 1521 の塩基に隣接する UAG、UGA 若しくは UAA で表されるいずれか 1 つのナンセンス塩基配列からなる塩基配列を含む RNA、並びに配列番号 27 に記載の塩基配列の塩基番号 1 乃至 1587 の塩基配列及び該塩基番号 1587 の塩基に隣接する UAG、UGA 若しくは UAA で表されるいずれか 1 つのナンセンス塩基配列からなる塩基配列を含む RNA が共に導入することにより、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク及び配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するタンパクを共発現している非ヒト由来の組換え細胞；または

(d) ヒト由来の腫瘍細胞；並びに

(2) 該物質と該放射性標識アミノ酸との共存下で培養した細胞が有する放射性、並びに該放射性標識アミノ酸のみの存在下で培養した細胞が有する放射性を測定し、各々の値の差異を比較する工程。

<49> 前記<7>～<11>のいずれかに記載の DNA で形質転換された細胞を用いる<48>に記載の方法。

<50> アフリカツメガエルの卵母細胞を用いる<48>に記載の方法。

<51> 前記<7>～<11>のいずれかに記載の DNA の mRNA への転写又は前記<1>～<5>のいずれかに記載のタンパクの発現を阻害する能力を有する物質を同定する方法。

<52> 前記<44>～<51>のいずれかに記載の方法により検出、スクリーニング又は同定された物質。

<53> 当該物質が、腫瘍細胞の増殖を阻害する能力を有する物質であることを特徴とする前記<52>に記載の物質。

<54> 外来性遺伝子を有するトランスジェニックマウスであって、該マウスは、その内在性遺伝子上に配列番号 2 又は 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパクをコードする DNA が組み込まれることにより、該タンパクを発現する細

胞を体内に有することを特徴とするトランスジェニックマウス。

< 5 5 > 当該DNAが、配列番号 1 に記載の塩基配列の塩基番号 6 6 乃至 1 5 8 6 の塩基配列及び該塩基番号 1 5 8 6 の塩基に隣接するTAG、TGA若しくはTAAで表されるいずれか 1 つのナンセンス塩基配列からなる塩基配列、又は配列番号 3 に記載の塩基配列の塩基番号 6 4 乃至 1 5 9 9 の塩基配列及び該塩基番号 1 5 9 9 の塩基に隣接するTAG、TGA若しくはTAAで表されるいずれか 1 つのナンセンス塩基配列からなる塩基配列を含むDNAであることを特徴とする前記< 5 4 >に記載のトランスジェニックマウス。

以下、本発明で用いる語句の意味、並びに本発明のDNA、タンパク、抗体、抗体産生細胞、形質転換体、標識DNA、標識RNA、標識抗体、医薬組成物、並びにトランスジェニックマウスなどの一般的製造方法並びにを明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。

本発明において用いられる「哺乳動物」なる用語は、ヒト、ウシ、ウマ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ニワトリ、ウサギ、ラット、ハムスター、モルモット、及びマウスなどのあらゆる哺乳動物を意味し、好ましくは、ヒト、ウシ、ウマ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ニワトリ、ウサギ、ラット、ハムスター、モルモット、及びマウスであり、特に好ましくは、ヒト、ラット、ハムスター、モルモット、及びマウスである。

本発明で用いられる「ヒト以外の哺乳動物」及び「非ヒト哺乳動物」なる用語は各々同義であり、前述に定義した哺乳動物におけるヒト以外のあらゆる哺乳動物を意味する。

本発明において用いられる「アミノ酸」とは、自然界に存在するあらゆるアミノ酸を意味し、好ましくは、アミノ酸を表記するために用いられるアルファベットの三文字表記法または一文字表記法に従って各々下記のように表されるアミノ酸を意味する。

グリシン (Gly/G)、アラニン (Ala/A)、バリン (Val/V)、ロイシン (Leu/L)、イソロイシン (Ile/I)、セリン (Ser/S)、スレオニン (Thr/T)、アスパラギン酸 (Asp/D)、グルタミン酸 (Glu/E)、アスパラギン (Asn/N)、

グルタミン (Glu/Q)、リジン (Lys/K)、アルギニン (Arg/R)、システイン (Cys/C)、メチオニン (Met/M)、フェニルアラニン (Phe/F)、チロシン (Tyr/Y)、トリプトファン (Trp/W)、ヒスチジン (His/H)、プロリン (Pro/P)。

アミノ酸は、それが有する電荷及び極性の状態に従って、酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸及び中性アミノ酸に分類される。上記のアミノ酸を、当該分類に従って分類するなら下記のように分類されるが、電荷及び極性の程度をさらに細分化する場合、あるいは他のパラメーターも考慮して分類する場合には、必ずしも下記のような分類が適さないアミノ酸も存在する。

(酸性アミノ酸)

アスパラギン酸 (Asp/D)、グルタミン酸 (Glu/E)

(塩基性アミノ酸)

リジン (Lys/K)、アルギニン (Arg/R)、ヒスチジン (His/H)

(中性アミノ酸)

ロイシン (Leu/L)、イソロイシン (Ile/I)、フェニルアラニン (Phe/F)、メチオニン (Met/M)、チロシン (Tyr/Y)、トリプトファン (Trp/W)、バリン (Val/V)、ヒスチジン (His/H)、スレオニン (The/T)、システイン (Cys/C)、アスパラギン (Asn/N)、グルタミン (Gln/Q)、グリシン (Gly/G)、アラニン (Ala/A)、セリン (Ser/S)、プロリン (Pro/P)

本発明において用いられる「タンパク」なる用語は、前述した哺乳動物に由来し、また上述したアミノ酸からなる固有のアミノ酸配列を有する分子を意味する。

本発明の「タンパク」は、前記<1>～<5>のいずれかに記載したとおりのタンパクである。より詳細には、

「アミノ酸の細胞内への輸送を媒介する能力を有する細胞表面タンパクであって、該タンパクは、下記(1)または(2)のタンパクを発現している細胞において、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)、フェニルアラニン (Phe)、メチオニン (Met)、チロシン (Tyr)、ヒスチジン (His)、トリプトファン (Trp)及びバリン (Val)からなる群から選ばれるいずれか1種類のアミノ酸の細胞内への取り込みを媒介する能力を有するものであることを特徴とするタンパク；

- (1) 配列番号 6 又は 8 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク；または
- (2) 配列番号 6 又は 8 に記載のアミノ酸配列を有するタンパクの相同タンパクであって、配列番号 5 又は 7 に記載の塩基配列を含む DNA にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA によりコードされるタンパク。」

上記本発明のタンパクは、即ち、本発明のタンパクが、配列番号 6 に記載されるアミノ酸配列を有するヒト由来細胞膜表面分子 4 F 2 h c または非ヒト動物由来のその相同タンパクが発現している細胞膜上に共に発現している場合に、該細胞に対して、上記少なくともいずれか 1 つのアミノ酸の細胞内への取り込みを誘導するような性質を与えることができるタンパクを意味する。

ここで「相同タンパク」とは、ヒト由来細胞膜表面分子 4 F 2 h c のアミノ酸配列（配列番号 6）に配列相同性を有し、進化的に共通の祖先タンパクに由来したものと考えられ、該ヒト由来 4 F 2 h c と同様の生理学的機能を有するヒト以外の動物種由来のタンパクを意味する。

本発明のタンパクは、好ましくは下記（1）または（2）のいずれかのタンパクである。

- (1) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク；または
- (2) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するタンパクであり、該タンパクは、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するタンパクを発現している細胞において、ロイシン（Leu）、イソロイシン（Ile）、フェニルアラニン（Phe）、メチオニン（Met）、チロシン（Tyr）、ヒスチジン（His）、トリプトファン（Trp）及びバリン（Val）からなる群から選ばれるいずれか 1 種類のアミノ酸の細胞内への取り込みを媒介する能力を有するものであることを特徴とするタンパク。

ここで「数個のアミノ酸」とは、複数個のアミノ酸を意味し、具体的には 1 乃至 40 個のアミノ酸、好ましくは 1 乃至 30 個のアミノ酸であり、さらに好ましくは 1 乃至 20 個のアミノ酸であり、特に好ましくは 1 乃至 10 個のアミノ酸である。

上記のような本発明のタンパクのアミノ酸配列中のアミノ酸の部分的改変（欠

失、置換、挿入、付加)は、該タンパクをコードする塩基配列を部分的に改変することにより導入することができる。この塩基配列の部分的改変は、既知の部位特異的変異導入法 (Site specific mutagenesis) を用いて常法により導入することができる (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 81, p. 5662-5666, 1984)。

本発明における「部分アミノ酸配列」とは、前述した本発明のタンパクの一態様であり、当該アミノ酸配列中の任意の部分アミノ酸配列 (タンパクフラグメント) を意味する。好ましくは、本発明のタンパクがその生物学的機能を発揮するために必要な部位、または本発明のタンパクが他のタンパク分子 (受容体やリガンド) と結合若しくは相互作用する部位を含む部分配列を挙げることができる。

また、本発明における「部分アミノ酸配列を含み、抗原性を有するポリペプチド」とは、前記の部分アミノ酸配列を含むポリペプチドであって、該ポリペプチドを、前述の哺乳動物の体内に投与したとき、該哺乳動物の免疫応答機構により非自己または異物と認識され、該哺乳動物の体内に該ポリペプチドに対する抗体を産生させることができるポリペプチドを意味する。

本発明のタンパクまたは本発明のタンパクのアミノ酸配列中の部分アミノ酸を含むポリペプチドは、後述するような遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより発現させることができる。

また、本発明のタンパクは、後述する本発明のRNAを、例えば、アフリカツメガエルの卵母細胞のような種々の細胞に注入することにより、DNAからmRNAへの転写を経ずに、細胞内に注入したRNAから直接タンパクへの翻訳を行うことによって発現させることができる (実験医学増刊, 「バイオシグナル実験法」, Vol. 11, No. 3, p. 30-38, 1993)。

本発明の「DNA」は、前記<7>~<11>のいずれかに記載されたとおりのDNAである。好ましい態様としては、前述の本発明のタンパクまたはポリペプチドコードするDNAであり、また本発明のタンパクをコードし得るDNAで

あれば、cDNA、該cDNAに相補的なDNA、及びゲノミックDNAなどいかなる塩基配列を有するDNAも包含する。さらに、本発明のDNAには、同一のアミノ酸をコードするコドンであればどのようなコドンから構成されるDNAも含まれる。また、本発明のDNAの好ましい態様の1つは、本発明のヒト由来のタンパクをコードするDNAである。

より詳細には、本発明のDNAは、下記(1)乃至(3)のいずれかに記載のDNAである。

(1) 前記<1>~<5>のいずれかに記載のタンパクをコードするDNA。  
ここで、該DNAには、当該タンパク、例えば配列番号2又は4に記載のアミノ酸配列からなるタンパクをコードするDNAであれば、cDNA、該cDNAに相補的なDNA、及びゲノミックDNAなどいかなる塩基配列を有するDNAも包含される。

(2) 配列番号1に記載の塩基配列の塩基番号66乃至1586の塩基配列及び該塩基番号1586の塩基に隣接するTAG、TGA若しくはTAAで表されるいずれか1つのナンセンス塩基配列、又は配列番号3に記載の塩基配列の塩基番号64乃至1599の塩基配列及び該塩基番号1599の塩基に隣接するTAG、TGA若しくはTAAで表されるいずれか1つのナンセンス塩基配列からなる塩基配列からなる塩基配列を含むDNA。

ここで、「ナンセンス塩基配列」とは、終止コドン、終結コドン、ナンセンスコドン、ターミネーションコドンあるいはターミネーションシグナルとも呼ばれるTAG、TGA若しくはTAAのいずれかの塩基配列を意味し、タンパク質の合成の終止点をコードしている塩基配列である。

(3) 配列番号1に記載の塩基配列の塩基番号66乃至1586の塩基配列、又は配列番号3に記載の塩基配列の塩基番号64乃至1599の塩基配列及び該塩基番号1599の塩基に隣接するTAG、TGA若しくはTAAで表されるいずれか1つのナンセンス塩基配列からなる塩基配列を有するDNAに、ストリンジントな条件下でハイブリダイズし、少なくとも1種類のアミノ酸の細胞内への取り込みを媒介する能力を有する細胞表面タンパクをコードするDNAであって、該アミノ酸の細胞内への取り込みが下記(イ)又は(ロ)のいずれかのタン



バクの共存に依存することなく媒介されることを特徴とするDNA:

(イ) 配列番号6又は8に記載のアミノ酸配列を有するタンパク;

(ロ) 配列番号6又は8に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するタンパク。

ここで、「数個のアミノ酸」とは、前述での定義したとおりの意味を有する。

また、ここで「ストリンジェントな条件下」とは、ハイブリダーゼーションを行わせるための条件を意味し、具体的には温度並びに塩濃度を意味する。該温度は、一般的に約36乃至約42℃が用いられるが、用いられるプローブの長さ及び相補性の程度に従って、下記のようにして設定することもできる。

例えば、50塩基以上のプローブを用い、0.9% NaCl下でハイブリダイゼーションを行う場合には、50%の解離を生ずる温度( $T_m$ )の目安を下記計算式から求め、ハイブリダイゼーションの温度を下記計算式のように設定することができる。

$$T_m = 82.3^{\circ}\text{C} + 0.41 \times (G+C) \% - 500/n - 0.61 \times (\text{フォルムアミド}) \%$$

( $n$ はプローブの塩基数を示す。)

$$\text{温度} = T_m - 25^{\circ}\text{C}$$

また、100塩基以上のプローブ( $G+C=40\sim50\%$ の場合)を用いる場合には、 $T_m$ が下記(1)及び(2)のように変化することを目安する。

(1) 1%ミスマッチ毎に、 $T_m$ が約1℃下がる。

(2) フォルムアミド1%毎に、 $T_m$ が0.6~0.7℃下がる。

従って、完全相補鎖の組み合わせの場合の温度条件は下記のようにすることができる。

(A) 65~75℃ (フォルムアミド無添加)

(B) 35~45℃ (50%フォルムアミド存在下)

また、不完全相補鎖の組み合わせの場合の温度条件は下記のようにすることができる。

(A) 45~55℃ (フォルムアミド無添加)

(B) 35～42℃ (30% フォルムアミド存在下)

また、23塩基以下のプローブを用いる場合の温度条件は、37℃とすることもできるし、また下記計算式を目安とすることもできる。

$$\text{温度} = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A} + \text{Tの数}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{C} + \text{Gの数}) - 5^{\circ}\text{C}$$

また、塩濃度は、通常5×SSCまたはこれと同等の塩濃度が設定される。

従って、本発明におけるハイブリダイゼーションにおける温度は、例えば約37℃に設定することができる。また塩濃度は、5×SSCまたはこれと同等の塩濃度に設定することができる。

上述した本発明のDNAは、いかなる方法で得られるものであってもよい。例えばmRNAから調製される相補DNA (cDNA)、ゲノムDNAから調製されるDNA、化学合成によって得られるDNA、RNAまたはDNAを鋳型としてPCR法で増幅させて得られるDNAおよびこれらの方法を適当に組み合わせて構築されるDNAのいずれもが、本発明のDNAに包含される。

本発明のタンパクをコードするDNAは、常法に従って本発明のタンパクのmRNAからcDNAをクローン化する方法、ゲノムDNAを単離してスプライシング処理する方法、化学合成する方法等により取得することができる。

(1) 例えば、本発明のタンパクのmRNAからcDNAをクローン化する方法としては以下の方法が例示される。

まず、本発明のタンパクを発現・産生する前述のような組織あるいは細胞から該本発明のタンパクをコードするmRNAを調製する。mRNAの調製は、例えばグアニジンチオシアネート法 (チャーグウィン (Chirgwin) ら、バイオケミストリー (Biochemistry)、第18巻、第5294頁、1979年)、熱フェノール法もしくはAGPC法等の公知の方法を用いて調製した全RNAをオリゴ (dT) セルロースやポリU-セファロース等によるアフィニティクロマトグラフィーにかけることによって行うことができる。

次いで得られたmRNAを鋳型として、例えば逆転写酵素を用いる等の公知の

方法、例えばオカヤマらの方法（モレキュラーセルバイオロジー（Mol. Cell. Biol.）、第2巻、第161頁、1982年及び同誌、第3巻、第280頁、1983年）やホフマン（Hoffman）らの方法（ジーン（Gene）、第25巻、第263頁、1983年）等によりcDNA鎖を合成し、cDNAの二本鎖cDNAへの変換を行う。このcDNAをプラスミドベクターもしくはファージベクターに組み込み、大腸菌を形質転換して、あるいはインビトロパッケージング後、大腸菌に形質移入（トランスフェクト）することによりcDNAライブラリーを作製する。

ここで用いられるプラスミドベクターとしては、宿主内で複製保持されるものであれば特に制限されず、また用いられるファージベクターとしても宿主内で増殖できるものであれば良い。常法的に用いられるクローニング用ベクターとしてλZipLox、pUC19、λgt10、λgt11等が例示される。ただし、後述の免疫学的スクリーニングに供する場合は、宿主内で本発明のタンパクをコードする遺伝子を発現させるプロモーターを有したベクターであることが好ましい。

プラスミドにcDNAを組み込む方法としては、例えばマニアティス（Maniatis）らの方法（モレキュラークローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル（Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition）、コールドスプリングハーバーラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory）、第1.53頁、1989年）に記載の方法などが挙げられる。また、ファージベクターにcDNAを組み込む方法としては、ヒュン（Hyunh）らの方法（DNAクローニング、プラクティカルアプローチ（DNA Cloning, a practical approach）、第1巻、第49頁、1985年）などが挙げられる。簡便には、市販のクローニングキット（例えば、GIBCO製あるいは宝酒造製等）を用いることもできる。このようにして得られる組換えプラスミドやファージベクターは、原核細胞（例えば、E. Coli: HB101、DH5αまたはMC1061/P3等）等の適当な宿主に導入する。

プラスミドを宿主に導入する方法としては、（モレキュラークローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル（Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition）、コールドスプリングハーバーラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory）、第1.74頁、1989年）に記載の塩化カルシウム法または塩化カ

ルシウム／塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。また、ファージベクターを宿主に導入する方法としてはファージDNAをインビトロパッケージングした後、増殖させた宿主に導入する方法等が例示される。インビトロパッケージングは、市販のインビトロパッケージングキット（例えば、ストラタジーン製、アマシャム製等）を用いることによって簡便に行うことができる。

上記の方法によって作製されたcDNAライブラリーから、本発明のタンパクをコードするcDNAを単離する方法は、一般的なcDNAスクリーニング法を組み合わせることによって行うことができる。

例えば、別個に本発明のタンパクのアミノ酸配列をコードする塩基配列の一部または全部を含むDNA、あるいは該塩基配列と相同性を有するDNAを調製したのち、これを $^{32}\text{P}$ または $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ で標識してプローブとなし、公知のコロニーハイブリダイゼーション法（克蘭シュタイン（Crunstein）ら、プロシーディングスオブナショナルアカデミーオブサイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）、第72巻、第3961頁、1975年）またはブランクハイブリダイゼーション法（Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 第2.108頁、1989年）により、目的のcDNAを含有するクローンをスクリーニングする方法、あるいはPCRプライマーを作製し本発明のタンパクの特定領域をPCR法により増幅し、該領域をコードするDNA断片を有するクローンを選択する方法等が挙げられる。

また、cDNAを発現しうるベクター（例えば、 $\lambda$ ZipLox、 $\lambda$ gt11ファージベクター）を用いて作製したcDNAライブラリーを用いる場合には、本発明のタンパクに反応性を有する抗体を用いる抗原抗体反応を利用して、目的のクローンを選択することができる。大量にクローンを処理する場合には、PCR法を利用したスクリーニング法を用いることが好ましい。

この様にして得られたDNAの塩基配列はマキサム・ギルバート法（マキサム（Maxam）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、第74巻、第560頁、1977年）、ファージM13を用いたジデオキシヌクレオチド合成鎖停止の方法（サンガー（Sanger）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、第74巻、第5463～5467頁、1977年）、あるいはダイターミネーターサイクルシーケンシング

法 (Applied Biosystems社製) によって決定することができる。本発明のタンパクをコードする遺伝子は、その全部または一部を上記のようにして得られるクローンから制限酵素等により切り出すことにより取得できる。

(2) また、前述のような本発明のタンパクを発現する細胞に由来するゲノムDNAから本発明のタンパクをコードするDNAを単離することによる調製方法としては、例えば以下の方法が例示される。該細胞を好ましくはSDSまたはプロテナーゼK等を用いて溶解し、フェノールによる抽出を反復してDNAの脱蛋白質を行う。RNAを好ましくはリボヌクレアーゼにより消化する。得られるDNAを適当な制限酵素により部分消化し、得られるDNA断片を適当なファージまたはコスミドで増幅しライブラリーを作成する。そして目的の配列を有するクローンを、例えば放射性標識されたDNAプローブを用いる方法等により検出し、該クローンから本発明のタンパクをコードする遺伝子の全部または一部を制限酵素等により切り出し取得する。

(3) また、本発明のDNAの一態様である配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパクをコードするcDNAの製造は、配列番号1に記載される塩基配列をもとにして、常法に従って行うことができる。

例えば、ラットC6グリオーマ細胞を遺伝子源として用い、これからmRNA (ポリ(A)-RNA) を調製する。これを、分画し各画分について、4F2hcのcRNAとともに、アフリカツメガエルの卵母細胞に導入する。

4F2hcの遺伝子のcDNAはすでに報告されている[Broerら、Biochem. J.、第312巻、863項、1995年]ので、この配列情報から、PCR法などを用いて、容易に4F2hcの遺伝子を得ることが可能である。得られた4F2hcのcDNAから、T3又はT7RNAポリメラーゼ等を用いて、これに相補的なRNA (cRNA) (キャプ化されたもの) を合成できる。

mRNAと4F2hcのcRNAを導入した卵母細胞について、例えば、ロイシンなどを基質として、細胞内への基質の輸送 (取り込み) を測定し、高い取り込み活性を示したmRNA画分を選択することにより、LAT1のmRNAを濃

縮できる。この濃縮されたmRNAをもとにcDNAライブラリーを作製する。ライブラリーのcDNAから、約500クローンを一グループとして、cRNA（キャップ化されたもの）を調製し、各々のグループについて、4F2hcのcRNAとともに卵母細胞に導入し、基質の取り込み活性を指標として、陽性グループを選択する。陽性グループが見い出せたら、それをさらにサブグループに分け、同様の操作を繰り返すことにより、LAT1遺伝子のcDNAを含むクローンを得ることができる。

得られたcDNAについては、常法により塩基配列を決定し、翻訳領域を解析して、これにコードされるタンパク質、すなわち、LAT1のアミノ酸配列を決定することができる。

得られたcDNAが、中性アミノ酸トランスポーター遺伝子のcDNAであること、すなわち、cDNAにコードされた遺伝子産物が中性アミノ酸トランスポーターであることは、例えば次のようにして検証することができる。すなわち、得られたLAT1遺伝子のcDNAから調製したcRNAを4F2hcのcRNAとともに卵母細胞内に導入して発現させ、中性アミノ酸を細胞内へ輸送する（取り込む）能力を、前記と同様、適当な中性アミノ酸を基質とする通常の実験（Kanai and Hediger, *Nature*, 360, 467-471 (1992)）により、細胞内への基質の取り込みを測定することにより確認できる。

また、発現細胞について、同様の取り込み実験を応用して、LAT1の特性、例えば、LAT1がアミノ酸の交換輸送を行っているという特性や、LAT1の基質特異性などを調べることができる。

得られたLAT1遺伝子のcDNAを用いて、異なる遺伝子源で作製された適当なcDNAライブラリー又はゲノミックDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、異なる組織、異なる生物由来の相同遺伝子や染色体遺伝子等を単離することができる。

また、開示された本発明の遺伝子の塩基配列（配列番号1に示された塩基配列、もしくはその一部）の情報に基づいて設計された合成プライマーを用い、通常のPCR（Polymerase Chain Reaction）法によりcDNAライブラリー又はゲノミックDNAライブラリーから遺伝子を単離することができる。

後記の配列表の配列番号3は、ラットC6グリオーマ細胞株由来の中性アミノ酸トランスポーター（ラットLAT1）の遺伝子の全長cDNA塩基配列（約3.5 kbp）、及びその翻訳領域にコードされたタンパク質のアミノ酸配列（512アミノ酸）を表わす。配列表の配列番号4には、ラットC6グリオーマ細胞株由来の中性アミノ酸トランスポーター（ラットLAT1）のアミノ酸配列（512アミノ酸）を表わす。

cDNAライブラリー又はゲノミックDNAライブラリー等のDNAライブラリーは、例えば、「Molecular cloning」（Sambrook, J., Fritsch, E. F. 及びManiatis, T. 著、Cold Spring Harbor Pressより1989に発刊）に記載の方法により調製することができる。あるいは、市販のライブラリーがある場合はこれを用いてもよい。

ヒト由来タンパクをコードするcDNAを取得する場合には、さらにヒトゲノムDNA（染色体DNA、ゲノミックDNA）が導入されたコスミドライブラリー（「ラボマニユアルヒトゲノムマッピング」、堀雅明及び中村祐輔 編、丸善出版）を作製し、該コスミドライブラリーをスクリーニングすることにより、目的のタンパクのコーディング領域のDNAを含む陽性クローンを得、該陽性クローンから切り出したコーディングDNAをプローブとして用い、前述のcDNAライブラリーをスクリーニングすることによっても調製することもできる。

後記の配列表の配列番号1は、ヒト由来の中性アミノ酸トランスポーター（ヒトLAT1）の遺伝子の全長cDNA塩基配列（約4.5 kbp）、及びその翻訳領域にコードされたタンパク質のアミノ酸配列（507アミノ酸）を表わす。配列表の配列番号2には、ヒト由来の中性アミノ酸トランスポーター（ヒトLAT1）のアミノ酸配列（507アミノ酸）を表わす。

なお、配列表の配列番号5は、ヒト由来の4F2hc蛋白質の遺伝子の全長cDNA塩基配列（約1.8 kbp）、及びその翻訳領域にコードされたタンパク質のアミノ酸配列（529アミノ酸）を表わし、配列表の配列番号6には、ヒト由来の4F2hc蛋白質のアミノ酸配列（529アミノ酸）を表わす。配列表の配列番号7は、ラット由来の4F2hc蛋白質の遺伝子の全長cDNA塩基配列

(約 1.8 kbp)、及びその翻訳領域にコードされたタンパク質のアミノ酸配列(527アミノ酸)を表わし、配列表の配列番号8には、ラット由来の4F2hc蛋白質のアミノ酸配列(527アミノ酸)を表わす。

本発明の「発現ベクター」は、上述の本発明のDNAを含有する組換えベクターを意味する。本発明の組換えベクターとしては、原核細胞及び/または真核細胞の各種の宿主内で複製保持または自己増殖できるものであれば特に制限されず、プラスミドベクターおよびファージベクターが包含される。

当該組換えベクターは、簡便には当業界において入手可能な組換え用ベクター(プラスミドDNAおよびバクテリアファージDNA)に本発明のDNAを常法により連結することによって調製することができる。用いられる組換え用ベクターとして具体的には、大腸菌由来のプラスミドとして例えばpBR322、pBR325、pUC12、pUC13、pUC19など、酵母由来プラスミドとして例えばpSH19、pSH15など、枯草菌由来プラスミドとして例えばpUB110、pTP5、pC194などが例示される。また、ファージとしては、λファージなどのバクテリオファージが、さらにレトロウイルス、ワクシニアウイルス、核多角体ウイルスなどの動物や昆虫のウイルス(pVL1393、インビトロゲン製)が例示される。さらには、pZL1を挙げることができる。

本発明のタンパクを発現させる目的においては、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、原核細胞および/または真核細胞の各種の宿主細胞中で本発明のタンパクを発現させることのできる能力を有するものであれば特に制限されない。例えば、pMAL C2、pEF-BOS(ヌクレイックアシッドリサーチ(Nucleic Acid Research)、第18巻、第5322頁、1990年等)あるいはpME18S(実験医学別冊「遺伝子工学ハンドブック」、1992年等)等を挙げることができる。

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくともプロモーター-オペレーター領域、開始コドン、本発明のタンパクをコードするDNA、終止コドン、ターミネーター領域および複製可能単位から構成され



る。

宿主として酵母、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合、発現ベクターは少なくともプロモーター、開始コドン、本発明のタンパクをコードするDNA、終止コドンを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、本発明のタンパクをコードする遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、選択マーカ領域または複製可能単位などを含んでいてもよい。また、目的に応じて通常用いられる遺伝子増幅遺伝子（マーカー）を含んでいてもよい。

細菌中で本発明のタンパクを発現させるためのプロモーター・オペレーター領域は、プロモーター、オペレーターおよび Shine-Dalgarno (SD) 配列（例えば、AAGGなど）を含むものである。例えば宿主がエシェリキア属菌の場合、好適にはTrpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーター、tacプロモーターなどを含むものが例示される。酵母中で本発明のタンパクを発現させるためのプロモーターとしては、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターが挙げられ、宿主がバチルス属菌の場合は、SL01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが挙げられる。また、宿主が哺乳動物細胞等の真核細胞である場合、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーターなどが挙げられる。好ましくは、SV-40、レトロウイルスである。しかし、特にこれらに限定されるものではない。また、発現にはエンハンサーの利用も効果的な方法である。

好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン（ATG）が例示される。

終止コドンとしては、常用の終止コドン（例えば、TAG、TGA、TAA）が例示される。

ターミネーター領域としては、通常用いられる天然または合成のターミネーターを用いることができる。

複製可能単位とは、宿主細胞中でその全DNA配列を複製することができる能

力をもつDNAを言い、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド（天然のプラスミドから調製されたDNAフラグメント）および合成プラスミド等が含まれる。好適なプラスミドとしては、E. ColiではプラスミドpBR322、もしくはその人工的修飾物（pBR322を適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント）が、酵母では酵母2 $\mu$ プラスミド、もしくは酵母染色体DNAが、また哺乳動物細胞ではプラスミドpRSVneo（ATCC 37198）、プラスミドpSV2dhfr（ATCC 37145）、プラスミドpdBPV-MMTneo（ATCC 37224）、プラスミドpSV2neo（ATCC 37149）等があげられる。

エンハンサー配列、ポリアデニレーション部位およびスプライシング接合部位については、例えばそれぞれSV40に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。

選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、ネオマイシンまたはカナマイシン等の抗生物質耐性遺伝子等が例示される。

遺伝子増幅遺伝子としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、グルタミン酸合成酵素遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子、オルニチンデカルボキシラーゼ遺伝子、ヒグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子、アスパルラートトランスカルバミラーゼ遺伝子等を例示することができる。

本発明の発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、本発明のタンパクをコードするDNA、終止コドンおよびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化やT4DNAリガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当なDNAフラグメント（例えば、リンカー、他のリストリクションサイトなど）を用いることができる。

本発明の「形質転換細胞」は、上述の本発明のDNAまたは発現ベクターで形質転換された細胞であり、宿主細胞としての原核細胞あるいは真核細胞に該DN

Aまたは発現ベクターを導入することにより調製することができる。

本発明で用いられる宿主細胞としては、前記の発現ベクターに適合し、形質転換されうるものであれば特に限定されず、本発明の技術分野において通常使用される天然細胞あるいは人工的に樹立された組換細胞など種々の細胞（例えば、細菌（エシェリキア属菌、バチルス属菌）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）、動物細胞または昆虫細胞などが例示される。

好ましくは大腸菌あるいは動物細胞であり、具体的には大腸菌（DH5 $\alpha$ 、TB1、HB101等）、マウス由来細胞（COP、L、C127、Sp2/0、NS-1またはNIH3T3等）、ラット由来細胞（PC12、PC12h等）、ハムスター由来細胞（BHK及びCHO等）、サル由来細胞（COS1、COS3、COS7、CV1及びVelo等）およびヒト由来細胞（Hela、2倍体線維芽細胞に由来する細胞、HEK293細胞、ミエローマ細胞およびNamalwa等）などが例示される。

発現ベクターの宿主細胞への導入（形質転換（形質移入））は従来公知の方法を用いて行うことができる。

例えば、細菌（E.coli、Bacillus subtilis等）の場合は、例えばCohenらの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol.69, p.2110, 1972）、プロトプラスト法（Mol. Gen. Genet., Vol.168, p.111, 1979）やコンピテント法（J. Mol. Biol., Vol.56, p.209, 1971）によって、Saccharomyces cerevisiaeの場合は、例えばハイネン（Hinnen）らの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol.75, p.1927, 1978）やりチウム法（J. Bacteriol., Vol.153, p.163, 1983）によって、動物細胞の場合は、例えばグラハム（Graham）の方法（Virology, Vol.52, p.456, 1973）、昆虫細胞の場合は、例えばサマーズ（Summers）らの方法（Mol. Cell. Biol., Vol.3, p.2156-2165, 1983）によってそれぞれ形質転換することができる。

本発明の「タンパク」は、上記の如く調製される発現ベクターを含む形質転換

細胞（以下、形質移入体を包含する意味で使用する。）を栄養培地で培養することによって発現させることができる。

栄養培地は、宿主細胞（形質転換体）の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また所望により他の栄養素（例えば、無機塩（例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム）、ビタミン類、抗生物質（例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等）など）を含んでいてもよい。

培養は当業界において知られている方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地のpHおよび培養時間は、本発明のタンパクが大量に発現されるように適宜選択される。

なお、下記に宿主細胞に応じて用いられる具体的な培地および培養条件を例示するが、何らこれらに限定されるものではない。

宿主が細菌、放線菌、酵母、糸状菌である場合、例えば上記栄養源を含有する液体培地が適当である。好ましくは、pHが5～8である培地である。

宿主がE. coliの場合、好ましい培地としてLB培地、M9培地（ミラー（Miller）ら、Exp. Mol. Genet. Cold Spring Harbor Laboratory, p. 431, 1972）等が例示される。かかる場合、培養は、必要により通気、攪拌しながら、通常14～43℃、約3～24時間行うことができる。

宿主がBacillus属菌の場合、必要により通気、攪拌をしながら、通常30～40℃、約16～96時間行うことができる。

宿主が酵母である場合、培地として、例えばBurkholder最小培（ボスチアン（Bostian）, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, p. 4505, 1980）が挙げられ、pHは5～8であることが望ましい。培養は通常約20～35℃で約14～144時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

宿主が動物細胞の場合、培地として例えば約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 (Science, Vol. 122, p. 501, 1952)、DMEM培地 (Virology, Vol. 8, p. 396, 1959)、RPMI 1640培地 (J. Am. Med. Assoc., Vol. 199, p. 519, 1967)、199培地 (proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol. 73, p. 1, 1950) 等を用いることができる。培地のpHは約6～8であるのが好ましく、培養は通常約30～40℃で約15～72時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

宿主が昆虫細胞の場合、例えば胎児牛血清を含むGrace's培地 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, p. 8404, 1985) 等が挙げられ、そのpHは約5～8であるのが好ましい。培養は通常約20～40℃で15～100時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

本発明のタンパクは、前述した本発明のDNAまたは発現ベクターを用いて上述のようにして作製した形質転換体を前記のような培養条件下で培養することにより発現させることができる。

本発明のタンパクを可溶性タンパクとして調製する場合には、該細胞培養後、細胞を集め、適当な緩衝液に懸濁し、例えば超音波やリゾチーム及び凍結融解などの方法で細胞等の細胞壁および/または細胞膜を破壊した後、遠心分離やろ過などの方法で本発明のタンパクを含有する膜画分を得る。該膜画分をトライトン-X 100等の界面活性剤を用いて可溶化して粗溶液を得る。該粗溶液を蛋白質を精製並びに単離するために一般に用いられる精製方法に供することにより、本発明のタンパクを可溶性タンパクをして単離することができる。

単離、精製方法としては、例えば塩析、溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動など分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーやヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

本発明の「RNA」は、前記<5>に記載した下記のとりのRNAである。

「配列番号26に記載の塩基配列の塩基番号1乃至1521の塩基配列及び該塩基番号1521の塩基に隣接するUAG、UGA若しくはUAAで表されるいずれか1つのナンセンス塩基配列からなる塩基配列を含むRNA。」

ここで、「ナンセンス塩基配列」とは、終止コドン、終結コドン、ナンセンスコドン、ターミネーションコドンあるいはターミネーションシグナルとも呼ばれるUAG、UGA若しくはUAAのいずれかの塩基配列を意味し、タンパク質への翻訳の終止点をコードしている塩基配列である。

該本発明のRNAは、前記<1>に記載のDNA、即ち「配列番号1に記載の塩基配列の塩基番号66乃至1586の塩基配列及び該塩基番号1586の塩基に隣接するTAG、TGA若しくはTAAで表されるいずれか1つのナンセンス塩基配列からなる塩基配列を含むDNA。」に相補的なDNA配列を鋳型として、市販のRNAポリメラーゼ（例えば、T7RNAポリメラーゼなど）を用いて常法により調製することができる。

該本発明のRNAは、種々細胞で本発明のタンパクを発現させるために使用することができる。即ち、該本発明のRNAを、例えば、アフリカツメガエルの卵母細胞に注入することにより、DNAからmRNAへの転写を経ずに、注入したRNAから直接本発明のタンパクを細胞に発現させることができる（実験医学増刊、「バイオシグナル実験法」、Vol.11, No.3, p.30-38, 1993）。

本発明の他の1つは、前記<4>に記載した下記のとりのDNAである。

「配列番号1に記載の塩基配列中の部分塩基配列を含むDNA若しくは該DNAの一部が化学修飾されているDNA、または該部分塩基配列に相補的な塩基配列を含むDNA若しくは該DNAの一部が化学修飾されているDNAであって、下記（1）及び（2）の特徴を有するDNA：

（1）該部分塩基配列は配列番号3に記載の塩基配列中の部分塩基配列とは完全には一致しない塩基配列である；及び

（2）該DNAまたは該化学修飾されているDNAは、配列番号2に記載のア

ミノ酸配列を有するタンパクをコードする遺伝子にハイブリダイズする。」

ここで、「配列番号 1 に記載の塩基配列中の部分塩基配列」とは、配列番号 1 に記載の塩基配列中に含まれる任意の部位における任意の数の塩基からなる部分塩基配列を意味する。

当該 DNA は、DNA ハイブリダーゼーションまたは RNA ハイブリダイゼーションの操作におけるプローブとして有用である。当該 DNA をプローブとして用いる目的においては、該部分塩基配列としては、連続した 20 塩基以上の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した 50 塩基以上の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した 100 塩基以上の部分塩基配列、より好ましくは連続した 200 塩基以上の部分塩基配列、特に好ましくは連続した 300 塩基以上の部分塩基配列が挙げられる。

また、上記 DNA は、PCR におけるプライマーとしても有用である。該 DNA を PCR プライマーとして用いる目的においては、該部分塩基配列としては、連続した 5 乃至 100 塩基の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した 5 乃至 70 塩基の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した 5 乃至 50 塩基の部分塩基配列、より好ましくは連続した 5 乃至 30 塩基の部分塩基配列が挙げられる。

さらに、上記 DNA は、アンチセンス医薬としても有用である。即ち、該 DNA は、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパクコードする DNA または RNA にハイブリダイズすることにより、該 DNA の mRNA への転写あるいは該 mRNA のタンパクへの翻訳を阻害することもできる。

上記 DNA をアンチセンス医薬として用いる目的においては、該部分塩基配列としては、連続した 5 乃至 100 塩基の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した 5 乃至 70 塩基の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した 5 乃至 50 塩基の部分塩基配列、より好ましくは連続した 5 乃至 30 塩基の部分塩基配列が挙げられる。

また、この DNA をアンチセンス医薬として用いる場合には、該 DNA が患者の体内に投与された場合の血中半減期の増大（安定性）、細胞内膜の透過性の増大、あるいは経口投与の場合の消化器官での分解耐性の増大若しくは吸収の増大などの目的のために、該 DNA の塩基配列の一部に化学修飾を施すことが可能で

ある。化学修飾としては、例えば、オリゴヌクレオチドの構造中のリン酸結合、リボース、核酸塩基、糖部位、3' 及び/または5' 末端等の化学修飾が挙げられる。

リン酸結合の修飾としては、1 以上の該結合を、ホスホジエステル結合（D-オリゴ）、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合（S-オリゴ）、メチルホスホネート結合（MP-オリゴ）、ホスホロアミデート結合、非リン酸結合及びメチルホスホノチオエート結合のいずれかまたはそれらの組み合わせへの変更を挙げることができる。リボースの修飾としては、2'-フルオロリボースあるいは2'-O-メチルリボースへなどへの変更を挙げることができる。核酸塩基の修飾としては、5-プロピニルウラシルまたは2-アミノアデニンなどへの変更が挙げられる。

本発明の他の1つは、前記<6>に記載した下記のと通りのRNAである。

「配列番号26に記載の塩基配列に相補的な塩基配列を有するRNAの塩基配列中の部分塩基配列を含むRNAまたは該RNAの一部が化学修飾されているRNAであって、該RNAまたは該化学修飾されているRNAは、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパクをコードするRNAにハイブリダイズすることを特徴とするRNA。」

ここで、「部分塩基配列」とは、任意の部位における任意の数の塩基からなる部分塩基配列を意味する。

上記DNAは、アンチセンス医薬として有用である。即ち、該RNAは、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパクをコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズすることにより、該DNAのmRNAへの転写あるいは該mRNAのタンパクへの翻訳を阻害することができる。

上記RNAをアンチセンス医薬として用いる目的においては、該部分塩基配列としては、連続した5乃至100塩基の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した5乃至70塩基の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した5乃至50塩基の部分塩基配列、より好ましくは連続した5乃至30塩基の部分塩基配列が挙げられる。



また、このRNAをアンチセンス医薬として用いる場合には、該RNAが患者の体内に投与された場合の血中半減期の増大、細胞内膜の透過性の増大、あるいは経口投与の場合の消化器官での分解耐性の増大若しくは吸収の増大などの目的のために、該RNAの塩基配列の一部に化学修飾を施すことが可能である。化学修飾としては、例えば、前述のアンチセンスDNAに適用されるような化学修飾を挙げることができる。

本発明の「抗体」とは、ポリクローナル抗体（抗血清）あるいはモノクローナル抗体であり、好ましくはモノクローナル抗体である。

具体的には、本発明のタンパクまたはその一部に反応性を有する抗体である。

本発明の「抗体」は、本発明のタンパク若しくはその一部（天然体、組換え体、化学合成物を含む）、または該タンパクを発現している細胞（天然細胞、形質転換細胞、正常細胞または腫瘍細胞等の種類を問わない）を免疫原（抗原）として用い、常法に従って、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ニワトリ、ウサギ、ヤギあるいはヒツジ等の非ヒト哺乳動物に免疫することにより得られる天然型抗体、遺伝子組換え技術を用いて製造され得る組換えキメラモノクローナル抗体及び組換えヒト型モノクローナル抗体（CDR-grafted抗体）、並びにヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造され得るヒト抗体を包含する。

またモノクローナル抗体の場合には、IgG、IgM、IgA、IgDあるいはIgE等のいずれのアイソタイプを有するモノクローナル抗体をも包含する。好ましくは、IgGまたはIgMである。

本発明で言うポリクローナル抗体（抗血清）あるいはモノクローナル抗体は、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。

即ち、例えば、前記のような免疫原（抗原）を、必要に応じてフロイントアジュバント（Freund's Adjuvant）とともに、哺乳動物、好ましくは、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ウマあるいはウシ、より好ましくはマウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはウサギに免疫することにより製造できる。

ポリクローナル抗体（抗血清）は、該免疫感作動物から得た血清から取得する

ことができる。

またモノクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た該抗体産生細胞（脾臓、リンパ節、骨髄あるいは扁桃等、好ましくは脾臓のB細胞）と自己抗体産生能のない骨髄腫系細胞（ミエローマ細胞）からハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを免疫学的測定法（ELISAなど）により選択することによって製造される。

モノクローナル抗体は、具体的には下記のようにして製造することができる。即ち、本発明のタンパク若しくはその一部（天然体、組換え体、化学合成物を含む）、または該タンパクを発現している細胞（天然細胞、形質転換細胞、正常細胞または腫瘍細胞等の種類を問わない）を免疫原として、該免疫原を、必要に応じてフロイントアジュバント（Freund's Adjuvant）とともに、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ニワトリあるいはウサギ、好ましくはマウス、ラットあるいはハムスター（ヒト抗体産生トランスジェニックマウスのような他の動物由来の抗体を産生するように作出されたトランスジェニック動物を含む）の皮下内、筋肉内、静脈内、フッドパッド内あるいは腹腔内に1乃至数回注射するかあるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約1乃至14日毎に1乃至4回免疫を行って、最終免疫より約1乃至5日後に免疫感作された該哺乳動物から抗体産生細胞を取得することができる。

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法（ネイチャー（Nature）、第256巻、第495～第497頁、1975年）及びそれに準じる修飾方法に従って行うことができる。

即ち、前述の如く免疫感作された哺乳動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髄あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒト由来の自己抗体産生能のないミエローマ細胞との細胞融合させることにより調製される。

細胞融合に用いられるミエローマ細胞としては、例えばマウス由来ミエローマ P3/X63-AG8.653（653; ATCC No. CRL1580）、P3/NSI/1-

Ag 4-1 (NS-1)、P 3 / X 6 3 - Ag 8、U 1 (P3U1)、SP 2 / 0 - Ag 1 4 (Sp2/0、Sp2)、PAI、F 0ある いはBW 5 1 4 7、ラット由来ミエローマ2 1 0 R C Y 3 - Ag. 2. 3.、ヒト由来ミエローマU-2 6 6 A R 1、GM 1 5 0 0 - 6 T G - A 1 - 2、UC 7 2 9 - 6、CEM-AGR、D 1 R 1 1あるいはCEM-T 1 5を使用することができる。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の前述のマウス免疫感作で用いた免疫抗原に対する反応性を、例えばRIAやELISA等の酵素免疫測定法によって測定することにより行うことができる。

ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロ、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中等でのインビボで行い、得られた培養上清、または哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。

インビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

基本培地としては、例えば、Ham' F 1 2培地、MCDB 1 5 3培地あるいは低カルシウムMEM培地等の低カルシウム培地及びMCDB 1 0 4培地、MEM培地、D-MEM培地、RPMI 1 6 4 0培地、ASF 1 0 4培地あるいはRD培地等の高カルシウム培地等が挙げられ、該基本培地は、目的に応じて、例えば血清、ホルモン、サイトカイン及び／または種々無機あるいは有機物質等を含むことができる。

モノクローナル抗体の単離、精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈澱法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー (DEAEまたはDE52等)、抗イムノグロブリンカラムあ

るいはプロテインAカラム等のアフィニティカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。

また、当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、トランスジェニック動物作製技術を用いて当該抗体コーディング遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれたトランスジェニックなウ、ヤギ、ヒツジまたはブタを作製し、当該トランスジェニック動物のミルク中から当該抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である（日系サイエンス、1997年4月号、第78頁乃至84頁）。

本発明の「組換えキメラモノクローナル抗体」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、例えば、その可変領域がマウスイムノグロブリン由来の可変領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするマウス／ヒトキメラモノクローナル抗体等のキメラモノクローナル抗体を意味する。

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明における組換えキメラモノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。

本発明におけるキメラモノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

例えば、マウス／ヒトキメラモノクローナル抗体は、実験医学（臨時増刊号）、第1.6巻、第10号、1988年及び特公平3-73280号公報等を参照しながら作製することができる。

即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから単離した該マウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なV<sub>H</sub>遺伝子（H鎖可変領域をコードする再配列されたVDJ遺伝子）の下流に、ヒトイムノグロブリンをコードするDNAから取得したC<sub>H</sub>遺伝子（H鎖定常領域をコードするC遺

伝子)を、また該ハイブリドーマから単離したマウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なV<sub>L</sub>遺伝子(L鎖可変領域をコードする再配列されたVJ遺伝子)の下流にヒトイムノグロムリンをコードするDNAから取得したC<sub>L</sub>遺伝子(L鎖定常領域をコードするC遺伝子)を、各々発現可能なように配列して1つ又は別々の発現ベクターに挿入し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞を培養することにより作製することができる。

具体的には、まず、マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから常法によりDNAを抽出後、該DNAを適切な制限酵素(例えばEcoRI、HindIII等)を用いて消化し、電気泳動に付して(例えば0.7%アガロースゲル使用)サザンブロット法を行う。泳動したゲルを例えばエチジウムブロマイド等で染色し、写真撮影後、マーカーの位置を付し、ゲルを2回水洗し、0.25MのHCl溶液に15分間浸す。次いで、0.4NのNaOH溶液に10分間浸し、その間緩やかに振盪する。常法により、フィルターに移し、4時間後フィルターを回収して2×SSCで2回洗浄する。フィルターを十分乾燥した後、ベッキング(75℃、3時間)を行う。ベッキング終了後に、該フィルターを0.1×SSC/0.1%SDS溶液に入れ、65℃で30分間処理する。次いで、3×SSC/0.1%SDS溶液に浸す。得られたフィルターをブレハイブリダイゼーション液と共にビニール袋に入れ、65℃で3~4時間処理する。

次に、この中に<sup>32</sup>P標識したプローブDNA及びハイブリダイゼーション液を入れ、65℃で12時間程度反応させる。ハイブリダイゼーション終了後、適切な塩濃度、反応温度および時間(例えば、2×SSC-0.1%SDS溶液、室温、10分間)のもとで、フィルターを洗う。該フィルターをビニール袋に入れ、2×SSCを少量加え、密封し、オートラジオグラフィーを行う。

上記サザンブロット法により、マウスモノクローナル抗体のH鎖及びL鎖を各々コードする再配列されたVDJ遺伝子及びVJ遺伝子を同定する。同定したDNA断片を含む領域をショ糖密度勾配遠心にて分画し、ファージベクター(例えば、Charon 4A、Charon 28、λEMBL3、λEMBL4等)に組み込み、該ファージベクターで大腸菌(例えば、LE392、NM539等)を形質転換し、ゲノムライブラリーを作製する。そのゲノムライブラリー

を適当なプローブ（H鎖J遺伝子、L鎖（κ）J遺伝子等）を用いて、例えばベントンデビス法（サイエンス（Science）、第196巻、第180～第182頁、1977年）に従って、ブラークハイブリダイゼーションを行い、再配列されたVDJ遺伝子あるいはVJ遺伝子を各々含むポジティブクローンを得る。得られたクローンの制限酵素地図を作製し、塩基配列を決定し、目的とする再配列されたV<sub>H</sub>（VDJ）遺伝子あるいはV<sub>L</sub>（VJ）遺伝子を含む遺伝子が得られていることを確認する。

一方、キメラ化に用いるヒトC<sub>H</sub>遺伝子及びヒトC<sub>L</sub>遺伝子を別に単離する。例えば、ヒトIgG1とのキメラ抗体を作製する場合には、C<sub>H</sub>遺伝子であるC<sub>H</sub>γ<sub>1</sub>遺伝子とC<sub>L</sub>遺伝子であるC<sub>L</sub>κ遺伝子を単離する。これらの遺伝子はマウス免疫グロブリン遺伝子とヒト免疫グロブリン遺伝子の塩基配列の高い相同性を利用してヒトC<sub>H</sub>γ<sub>1</sub>遺伝子及びヒトC<sub>L</sub>κ遺伝子に相当するマウスC<sub>H</sub>γ<sub>1</sub>遺伝子及びマウスC<sub>L</sub>κ遺伝子をプローブとして用い、ヒトゲノムライブラリーから単離することによって得ることができる。

具体的には、例えば、クローンIg146（プロシーディングスナショナルアカデミーオブサイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）、第75巻、第4709～第4713頁、1978年）からの3kbのHindIII-BamHI断片とクローンMEP10（プロシーディングスナショナルアカデミーオブサイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）、第78巻、第474～第478頁、1981年）からの6.8kbのEcoRI断片をプローブとして用い、ヒトのラムダCharon 4AのHaeIII-AluIゲノムライブラリー（セル（Cell）、第15巻、第1157～第1174頁、1978年）中から、ヒトC<sub>L</sub>κ遺伝子を含み、エンハンサー領域を保持しているDNA断片を単離する。また、ヒトC<sub>H</sub>γ<sub>1</sub>遺伝子は、例えばヒト胎児肝細胞DNAをHindIIIで切断し、アガロースゲル電気泳動で分画した後、5.9kbのバンドをλ788に挿入し、前記のプローブを用いて単離する。

このようにして単離されたマウスV<sub>H</sub>遺伝子とマウスV<sub>L</sub>遺伝子、及びヒトC<sub>H</sub>遺伝子とヒトC<sub>L</sub>遺伝子を用いて、プロモーター領域及びエンハンサー領域などを考慮しながらマウスV<sub>H</sub>遺伝子の下流にヒトC<sub>H</sub>遺伝子を、またマウスV<sub>L</sub>遺伝子

の下流にヒトC<sub>L</sub>遺伝子を、適切な制限酵素及びDNAリガーゼを用いて、例えばpSV2gptあるいはpSV2neo等の発現ベクターに常法に従って組み込む。この際、マウスV<sub>H</sub>遺伝子／ヒトC<sub>H</sub>遺伝子とマウスV<sub>L</sub>遺伝子／ヒトC<sub>L</sub>遺伝子のキメラ遺伝子は、一つの発現ベクターに同時に配置されてもよいし、各々別個の発現ベクターに配置することもできる。

このようにして作製したキメラ遺伝子挿入発現ベクターを、例えばP3X63・Ag8・653細胞あるいはSP210細胞といった、自らは抗体を産生していない骨髓腫細胞にプロトプラスト融合法、DEAEーデキストラン法、リン酸カルシウム法あるいは電気穿孔法等により導入する。形質転換細胞は、発現ベクターに導入された薬物耐性遺伝子に対応する薬物含有培地中での培養により選別し、目的とするキメラモノクローナル抗体産生細胞を取得する。

このようにして選別された抗体産生細胞の培養上清中から目的のキメラモノクローナル抗体を取得する。

本発明の「ヒト型抗体（CDR-grafted抗体）」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、例えば、その超可変領域の相補性決定領域の一部または全部がマウスモノクローナル抗体に由来する超可変領域の相補性決定領域であり、その可変領域の枠組領域がヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒト型モノクローナル抗体を意味する。

ここで、超可変領域の相補性決定領域とは、抗体の可変領域中の超可変領域に存在し、抗原と相補的に直接結合する部位である3つの領域（Complementarity-determining residue；CDR1、CDR2、CDR3）を指し、また可変領域の枠組領域とは、該3つ相補性決定領域の前後に介在する比較的保存された4つの領域（Framework；FR1、FR2、FR3、FR4）を指す。

換言すれば、例えばマウスモノクローナル抗体の超可変領域の相補性決定領域の一部または全部以外の全ての領域が、ヒトイムノグロブリンの対応領域と置き代わったモノクローナル抗体を意味する。

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG、IgM、IgA、IgD及

びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明におけるヒト型モノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。また、ヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域についても限定されるものではない。

本発明におけるヒト型モノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する組換えヒト型モノクローナル抗体は、特表平4-506458号公報及び特開昭62-296890号公報等を参照して、遺伝子工学的に作製することができる。

即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから、少なくとも1つのマウスH鎖CDR遺伝子と該マウスH鎖CDR遺伝子に対応する少なくとも1つのマウスL鎖CDR遺伝子を単離し、またヒトイムノグロブリン遺伝子から前記マウスH鎖CDRに対応するヒトH鎖CDR以外の全領域をコードするヒトH鎖遺伝子と、前マウスL鎖CDRに対応するヒトL鎖CDR以外の全領域をコードするヒトL鎖遺伝子を単離する。

単離した該マウスH鎖CDR遺伝子と該ヒトH鎖遺伝子を発現可能なように適当な発現ベクターに導入し、同様に該マウスL鎖CDR遺伝子と該ヒトL鎖遺伝子を発現可能なように適当なもう1つの発現ベクターに導入する。または、該マウスH鎖CDR遺伝子／ヒトH鎖遺伝子とマウスL鎖CDR遺伝子／ヒトL鎖遺伝子を同一の発現ベクターに発現可能なように導入することもできる。このようにして作製された発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによりヒト型モノクローナル抗体産生形質転換細胞を得、該形質転換細胞を培養することにより培養上清中から目的のヒト型モノクローナル抗体を得る。

本発明の「ヒト抗体」とは、イムノグロブリンを構成するH鎖の可変領域及びH鎖の定常領域並びにL鎖の可変領域及びL鎖の定常領域を含む全ての領域がヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するイムノグロブリンである。



ヒト抗体は、常法に従って、例えば、少なくともヒトイムノグロブリン遺伝子をマウス等のヒト以外の哺乳動物の遺伝子座中に組込むことにより作製されたトランスジェニック動物を、抗原で免疫感作することにより、前述したポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体の作製法と同様にして製造することができる。

例えば、ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスは、Nature Genetics, Vol. 15, p. 146-156, 1997) ; Nature Genetics, Vol. 7, p. 13-21, 1994 ; 特表平4-504365号公報 ; 国際出願公開W094/25585号公報 ; 日経サイエンス、6月号、第40～第50頁、1995年 ; Nature, Vol. 368, p. 856-859, 1994 ; 及び特表平6-500233号公報に記載の方法に従って作製することができる。

本発明における「抗体の一部」とは、前述の本発明における抗体、好ましくはモノクローナル抗体の一部分の領域を意味し、具体的にはF(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv (variable fragment of antibody)、sFv、dsFv (disulphide stabilised Fv) あるいはdAb (single domain antibody) である (Exp. Opin. Ther. Patents, Vol. 6, No. 5, p. 441-456, 1996)。

ここで、「F(ab')<sub>2</sub>」及び「Fab'」とは、イムノグロブリン (モノクローナル抗体) を、蛋白分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されてV<sub>L</sub> (L鎖可変領域) とC<sub>L</sub> (L鎖定常領域) からなるL鎖、及びV<sub>H</sub> (H鎖可変領域) とCH<sub>1</sub> (H鎖定常領域中のγ1領域) とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントを各々Fab'という。

またIgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つのFab'がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントをF(ab')<sub>2</sub>という。

本発明の「モノクローナル抗体を産生する細胞」とは、前述した本発明のモノクローナル抗体を産生する任意の細胞を意味する。具体的には、例えば、下記（１）乃至（３）のいずれかに記載される細胞を挙げることができる。

（１）前述したとおりの、本発明のタンパク、その一部または該タンパクを発現する細胞等で非ヒト哺乳動物を免疫して得られる本発明のタンパクまたはその一部に反応性を有するモノクローナル抗体を産生する該非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体産生Ｂ細胞。

（２）そのようにして得られた抗体産生Ｂ細胞を哺乳動物由来のミエローマ細胞と細胞融合して得られる前述のハイブリドーマ（融合細胞）。

（３）該モノクローナル抗体産生Ｂ細胞またはモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから単離される該モノクローナル抗体をコードする遺伝子（重鎖をコードする遺伝子若しくは軽鎖をコードする遺伝子のいずれか一方、または両方の遺伝子）により該Ｂ細胞及びハイブリドーマ以外の細胞を形質転換して得られるモノクローナル抗体産生形質転換細胞（遺伝子組換え細胞）。

ここで、前記（３）に記載のモノクローナル抗体産生形質転換細胞（遺伝子組換え細胞）は、即ち、前記（１）のＢ細胞または（２）のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体の遺伝子組換え体を産生する遺伝子組換え細胞を意味する。この組換えモノクローナル抗体産生細胞は、前述したキメラモノクローナル抗体及びヒト型抗体の製造において使用される方法と同様にして製造することができる。

本発明の「医薬組成物」とは、例えば下記（ａ）乃至（ｃ）のいずれかと薬学的に許容され得る担体とからなる医薬組成物である。

（ａ）前述で定義される抗体（好ましくはモノクローナル抗体。天然由来の抗体若しくは組換え抗体に限らない。）または該抗体の一部。

（ｂ）アンチセンス医薬として有用なＤＮＡ断片：例えば下記のようなＤＮＡ

:

「配列番号１又は３に記載の塩基配列中の部分塩基配列、好ましくは１４塩基

以上の部分塩基配列を含むDNA若しくは該DNAの一部が化学修飾されているDNA、または該部分塩基配列に相補的な塩基配列を含むDNA若しくは該DNAの一部が化学修飾されているDNA」

(c) アンチセンス医薬として有用なRNA断片：例えば下記のRNA：

「配列番号26又は27に記載の塩基配列に相補的な塩基配列を有するRNAの塩基配列中の部分塩基配列を含むRNAまたは該RNAの一部が化学修飾されているRNAであって、該RNAまたは該化学修飾されているRNAは、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパクをコードするRNAにハイブリダイズすることを特徴とするRNA。」

ここで「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、トロー剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。

これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤およびペッサリーなどが含まれる。

投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分（前記タンパクや抗体など）の種類などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき10 $\mu$ gから1000mg（あるいは10 $\mu$ gから500mg）の範囲で投与することができる。しかしながら、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量が必要な場合もある。

とりわけ注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の非毒性の薬学的に許容され得る担体中に0.1 $\mu$ g抗体/ml担体～10mg抗体/ml担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。

このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回

の投与において1kg体重あたり、1 $\mu$ g~100mgの割合で、好ましくは50 $\mu$ g~50mgの割合で、1日あたり1回~数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射のような医療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。

また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。

そのような注射剤の無菌化は、バクテリア保留フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合または照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

本発明の医薬組成物は、例えば、本発明のアミノ酸トランスポーター分子の生物活性または該分子の発現を阻害し、腫瘍細胞の生存または増殖に必須な栄養素としてのアミノ酸の細胞内への取り込みを阻害を阻害することが可能であり、例えば、癌の治療のために用いることができる。

本発明の「トランスジェニックマウス」は、本発明のタンパクに包含されるヒト由来のタンパクをコードするDNA（cDNAまたはゲノミックDNA）が、マウスの内在性遺伝子座上にインテグレート（integrate）されており、体内に該本発明のタンパクを発現するトランスジェニックマウスである。

具体的には、前記<52>または<53>に記載のした下記（1）または（2）のと通りのトランスジェニックマウスである。

（1）外来性遺伝子を有するトランスジェニックマウスであって、該マウスは、その内在性遺伝子上に配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパクをコードするDNAが組み込まれることにより、該タンパクを発現する細胞を体内に有することを特徴とするトランスジェニックマウス。

（2）該DNAが、配列番号1に記載の塩基配列の塩基番号66乃至1586の塩基配列及び該塩基番号1586の塩基に隣接するTAG、TGA若しくはTAAで表されるいずれか1つのナンセンス塩基配列からなる塩基配列を含むDN

Aであることを特徴とする前記(1)に記載のトランスジェニックマウス。

該トランスジェニックマウスは、トランスジェニック動物の製造において通常使用されるような常法(例えば、最新動物細胞実験マニュアル、エル・アイ・シー発行、第7章、第361～第408頁、1990年を参照)に従って作製することができる。

具体的には、正常マウス胚盤胞(blastocyst)のから取得した胚性幹細胞(Embryonic Stem Cell, ES Cell)を、本発明の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパクをコードする遺伝子及びマーカー遺伝子(例えば、ネオマイシン耐性遺伝子)が発現可能のように挿入された発現ベクターで形質転換する。該タンパクをコードする遺伝子が内在性遺伝子上にインテグレートされたES細胞を、マーカー遺伝子の発現の有無に基づいて常法により選別する。次いで、選別したES細胞を、別の正常マウスから取得した受精卵(胚盤胞)にマイクロインジェクションする(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, No. 12, pp. 7380-7384, 1980; 米国特許第4,873,191号公報)。該胚盤胞を仮親としての別の正常マウスの子宮に移植する。そうして該仮親マウスから、ファウンダーマウス(子マウス)が生まれる。該ファウンダーマウスを正常マウスと交配させることによりヘテロトランスジェニックマウスを得る。該ヘテロ(heterogeneous)トランスジェニックマウス同士を交配することにより、メンデルの法則に従って、ホモトランスジェニックマウス(homogeneous transgenic mouse)が得られる。

また、本発明に包含されるマウスに由来するタンパクをコードするDNA(特にゲノミックDNA)、即ち、配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するヒト由来アミノ酸トランスポーターのマウスホモログをコードするDNA(特にゲノミックDNA)の塩基配列に基づいて、いわゆる「ノックアウトマウス」を作製することができる。

該ノックアウトマウスとは、該マウスホモログタンパクをコードする内在性遺伝子がノックアウト(不活性化)されたマウスであり、例えば相同組換えを応用したポジティブネガティブセレクション法(米国特許第5,464,764号公報、同5,487,992号公報、同5,627,059号公報、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, 8932-8935, 1989, Nature, Vol. 342, 435-438, 1989など)を用いて作製すること

ができる。このようなノックアウトマウスも本発明の一態様である。

本発明の「標識DNA」とは、後述の「標識モノクローナル抗体」の標識に用いられる、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジン、または放射性同位体 ( $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$  若しくは  $^{131}\text{I}$  等) などで標識してなるDNAである。

例えば、放射性同位体で標識した放射性標識DNAは、本発明のタンパクをコードする遺伝子の同定における試験種々の試験方法、例えば、サザンブロッティング (実験医学・別冊、「遺伝子工学ハンドブック」、羊土社発行、p. 133-140、1992年) における試薬として用いることができる。

また、放射性物質またはビオチンなどの非放射性物質で標識した標識DNAは、本発明のタンパクをコードするゲノミックDNAの染色体上の位置を解析するための *in situ* ハイブリダーゼーション (例えば、FISH (Fluorescence *in situ* hybridization)、実験医学・別冊、「遺伝子工学ハンドブック」、羊土社発行、1992年、第271頁～第277頁) における試薬として用いることができる。

本発明の「放射性標識RNA」とは、本発明のRNAを、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$  若しくは  $^{131}\text{I}$  等の放射性同位体で標識してなるDNAである。

該放射性標識RNAは、細胞、組織あるいは臓器における本発明のタンパクをコードするmRNAの発現状態の分析、例えば、ノーザンブロッティング (実験医学・別冊、「遺伝子工学ハンドブック」、羊土社発行、p. 133-140、1992年) などにおける試薬として有用である。

本発明の「標識モノクローナル抗体」を標識するための「単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質」とは、それらを、前記に定義したモノクローナル抗体に物理化学的結合等により結合させることにより該モノクローナル抗体の存在を検出可能にするために用いられる物質を意味する。

具体的には、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジンあるいは放射性同位体等である。

さらに具体的には、ペルオキシダーゼ（例えば、horseradish peroxidase）、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ペニシリナーゼ、カタラーゼ、アポグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等の酵素、フルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンパク、希土類金属キレート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等の蛍光物質、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$ 若しくは $^{131}\text{I}$ 等の放射性同位体、ビオチン、アビジン、または化学発光物質が挙げられる。

ここで、放射性同位体及び蛍光物質は、単独で検出可能なシグナルをもたらすことができる。一方、酵素、化学発光物質、ビオチン及びアビジンは、単独では検出可能なシグナルをもたらすことができないため、さらに1種以上の他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらす。例えば、酵素の場合には少なくとも基質が必要であり、酵素活性を測定する方法（比色法、蛍光法、生物発光法あるいは化学発光法等）に依存して種々の基質が用いられる。例えば、ペルオキシダーゼの場合には、基質として過酸化水素を用いる。また、ビオチンの場合には少なくともアビジンあるいは酵素修飾アビジン（例えば、ストレプトアビジン- $\beta$ -ガラクトシダーゼ（Streptoavidin- $\beta$ -galactosidase））を基質として反応させるのが一般的であるが、この限りではない。必要に応じてさらに該基質に依存する種々の発色物質が用いられる。例えば、ビオチンの基質としてストレプトアビジン- $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いる場合には、発色物質として4-メチル-ウンベリフェリル- $\beta$ -D-ガラクトシド（4-Methyl-umbelliferyl- $\beta$ -D-galactoside）を用いることができる。

本発明の「標識モノクローナル抗体」及び前述した「標識DNA」とは、各々前記のような種々標識物質で標識されたモノクローナル抗体及びDNAを意味する。

該標識モノクローナル抗体は、前述した本発明のタンパクを検出あるいは定量するために用いることができる。具体的には、種々の生体試料、例えば、細胞

（正常細胞、疾患に罹患している生体由来の腫瘍細胞等の異常細胞、天然細胞、あるいは遺伝子組換え細胞等の種類を問わない）、組織（健常な生体または疾患に罹患している生体等の由来を問わない）または臓器（健常な生体または疾患に罹患している生体等の由来を問わない）での本発明のタンパクの発現の有無または発現量の測定に用いることができる。該測定は、慣用されている免疫組織学的技術を用いて常法に従って実施することができる（実験医学別冊、「細胞工学ハンドブック」、羊土社、p. 207-213、1992年）。

また、本発明の標識モノクローナル抗体は、前記の免疫組織学的試験だけでなく、被験試料としての該細胞、組織または臓器若しくはその一部から、常法にしたがって可溶性膜タンパクを調製し、該可溶性膜タンパクに該標識モノクローナル抗体を反応させることにより該可溶性膜タンパク中での本発明のタンパクの存否を確認することからなるウェスタンブロッティング法においても用いることができる（実験医学別冊、「細胞工学ハンドブック」、羊土社、p. 201-206、1992年）。

前記のような免疫学的測定方法においては、上記のいずれの標識物質で標識した標識モノクローナル抗体をも使用可能であるが、検出感度あるいは定量感度の高さ及び操作の利便性の点を考慮すると、ペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンで標識したモノクローナル抗体を用いるのが好ましい。

本発明はまた、上述の標識モノクローナル抗体を用いた免疫組織学的技術により本発明のタンパクを検出または定量する方法に関する。具体的には、前記したとおりの方法であり、例えば下記（１）及び（２）の工程を含む方法である。

（１）試料に本発明の標識モノクローナル抗体を接触させる工程；及び

（２）該試料に結合した該標識モノクローナル抗体の量を、該標識モノクローナル抗体に結合している標識物質の種類に応じて、蛍光、化学発光若しくは放射活性を検出することにより測定する工程。

ここで、「細胞」には、ヒト生体から取得した初代培養細胞（primary culture cell）、継代可能なように株化した細胞株、あるいは遺伝子操作が施された遺伝子組換え細胞（形質転換細胞）を含み、好ましくは初代培養細胞である。また、



該細胞には、正常細胞及び疾患に罹患している患者の生体から取得される異常細胞が包含される。該異常細胞としては、例えば種々の腫瘍細胞が挙げられる。また、「組織」とは、健常動物または疾患に罹患している患者の生体に由来する任意の組織を意味し、該患者の生体に由来する組織としては、腫瘍組織を挙げることができる。また、「臓器若しくはその一部」とは、健常動物または疾患に罹患している患者の生体に由来する任意の臓器またはその一部を意味する。該患者に由来する臓器としては、腫瘍を有する臓器が挙げられる。

該本発明の方法は、さらに具体的には、例えば下記のような工程を含むことができるが、この限りではない。

(工程 1) 例えば、外科手術時に切除され排除されるような健常人に由来する正常細胞、正常組織または正常臓器若しくはその一部、あるいは癌患者に由来する腫瘍細胞、腫瘍組織または腫瘍を有する臓器若しくはその一部(臓器若しくはその一部は、必要に応じ薄切して切片とすることができる)を、パラフォルムアルデヒド等により固定化し、固定化試料を作製する工程；

(工程 2) 該固定化試料に、ビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識した本発明の標識モノクローナル抗体を加え抗原抗体反応を行わせる工程；

(工程 3) 次いで、該固定化試料を必要に応じ洗浄した後、用いた酵素の種類に依存して種々の基質またはアビジン若しくはストレプトアビジン- $\beta$ -ガラクトシダーゼ等の酵素修飾アビジンを加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識抗体上の標識物質とを反応させる工程(基質については、例えば、工程 2 でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識抗体を用いた場合には、diaminobenzidine, 4-chloro-1-naphthol 若しくは aminoethylcarbazole のいずれかと共に過酸化水素を加えることができる。また、アビジンまたは酵素修飾アビジンは、工程 2 でビオチンで標識した標識抗体を用いた場合に用いられる)；

(工程 4) 工程 3 で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質(例えば、4-メチルーウンベリフェリル- $\beta$ -D-ガラクトシドなど)を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程

(工程 5) 必要に応じ、固定化試料を洗浄し、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

(工程 6) 固定化試料を、顕微鏡下で観察することにより、比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

本発明のアミノ酸トランスポータータンパクは、正常細胞での発現に比べ、幅広い種類の腫瘍細胞に特異的な発現が観察されることから、上記のような免疫組織学的方法を用いて生体由来の種々細胞または組織での該タンパクの発現の有無を検出することにより、該被験細胞あるいは被験組織が正常細胞であるかあるいは腫瘍細胞等の異常細胞であるかを判断できる可能性がある。

本発明の他の 1 つは、本発明のタンパクの生物活性を阻害する能力を有する物質を同定する方法である。具体的には、例えば前記した方法である。

「配列番号 2 又は 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパクの生物学的機能であって、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)、フェニルアラニン (Phe)、メチオニン (Met)、チロシン (Tyr)、ヒスチジン (His)、トリプトファン (Trp) 及びバリン (Val) からなる群から選ばれるいずれか 1 種類のアミノ酸の細胞内への取り込みを媒介する能力を阻害する能力を有する物質を同定する方法であって、該方法が、下記 (1) 並びに (2) の工程を含むことを特徴とする方法：

(1) 下記 (a) 乃至 (d) のいずれかの細胞を、該物質、並びにロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)、フェニルアラニン (Phe)、メチオニン (Met)、チロシン (Tyr)、ヒスチジン (His)、トリプトファン (Trp) 及びバリン (Val) からなる群から選ばれるいずれか 1 種類のアミノ酸を放射性同位体により標識してなる放射性標識アミノ酸との共存下、または該放射性標識アミノ酸のみの存在下で培養する工程：

(a) 配列番号 2 又は 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク及び配列番号 6 に記載のアミノ酸配列有するタンパクを共発現している天然に存在する細胞；

(b) 配列番号 1 又は 3 に記載の塩基配列のうちの翻訳領域の塩基配列を

含むDNAで共形質転換することにより、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク及び配列番号6又は8に記載のアミノ酸配列を有するタンパクを共発現している組換え細胞；

(c) 配列番号26に記載の塩基配列の塩基番号1乃至1521の塩基配列及び該塩基番号1521の塩基に隣接するUAG、UGA若しくはUAAで表されるいずれか1つのナンセンス塩基配列からなる塩基配列を含むRNA、並びに配列番号27に記載の塩基配列の塩基番号1乃至1587の塩基配列及び該塩基番号1587の塩基に隣接するUAG、UGA若しくはUAAで表されるいずれか1つのナンセンス塩基配列からなる塩基配列を含むRNAが共に導入することにより、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク及び配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するタンパクを共発現している非ヒト由来の組換え細胞；または

(d) ヒト由来の腫瘍細胞；並びに

(2) 該物質と該放射性標識アミノ酸との共存下で培養した細胞が有する放射性、並びに該放射性標識アミノ酸のみの存在下で培養した細胞が有する放射性を測定し、各々の値の差異を比較する工程。」

本方法は、即ち、本発明のアミノ酸トランスポータータンパク（配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する）とヒト由来細胞膜表面分子4F2hc（配列番号6に記載のアミノ酸配列を有する）とを共発現している細胞が、少なくともロイシン（Leu）、イソロイシン（Ile）、フェニルアラニン（Phe）、メチオニン（Met）、チロシン（Tyr）、ヒスチジン（His）、トリプトファン（Trp）またはバリン（Val）のいずれかのアミノ酸を取り込む能力を有するという性質を利用することを特徴とする方法である。

即ち、該被験物質の阻害活性は、該細胞を、放射性同位体（ $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$ 若しくは $^{131}\text{I}$ 等）により標識した上記いずれかのアミノ酸と被験物質との存在下での培養において該細胞が取り込む該標識アミノ酸の量を、被験物質を含まず該標識アミノ酸のみの存在下で培養した細胞が取り込む該標識アミノ酸の量とを比較することにより測定することができる。

該細胞としては、該2つのタンパク分子を共発現している細胞である限りどの

ような細胞をも利用し得る。例えば、上記（a）に記載されるような天然の細胞、（b）に記載されるような該両タンパク分子を各々コードする2つのDNAで形質転換された形質転換細胞（遺伝子組換え細胞）、（c）に記載されるような該両タンパク分子を各々コードするRNAが導入された細胞、あるいは（d）に記載されるとおりのヒト由来の腫瘍細胞のいずれかを用いることができる。

該形質転換細胞の調製に用いられる宿主細胞としては、前述の本発明のDNAを用いて本発明のタンパクを発現させる方法について詳述した部分に記載された種々の細胞を用いることができる。

例えば、本発明の技術分野において通常使用される天然細胞あるいは人工的に樹立された組換え細胞など種々の細胞（例えば、細菌（エシェリキア属菌、バチルス属菌）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）、動物細胞または昆虫細胞などが例示される。

好ましくは大腸菌あるいは動物細胞であり、具体的には大腸菌（DH5 $\alpha$ 、TBI、HB101等）、マウス由来細胞（COP、L、C127、Sp2/0、NS-1またはNIH3T3等）、ラット由来細胞（PC12、PC12h等）、ハムスター由来細胞（BHK及びCHO等）、サル由来細胞（COS1、COS3、COS7、CV1及びVelo等）およびヒト由来細胞（Hela、2倍体線維芽細胞に由来する細胞、HEK293細胞、ミエローマ細胞およびNamalwa等）などが例示される。

該RNAの注入する細胞としては、例えば、アフリカツメガエルの卵母細胞を挙げることができる（実験医学増刊、「バイオシグナル実験法」，Vol.11，No.3，p.30-38，1993）。

該ヒト由来の腫瘍細胞としては、いずれの腫瘍細胞であっても良いが、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク並びに配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するタンパクを共に発現していることが確認されている腫瘍細胞を用いるのが好ましい。

ここで、「物質」とは、自然界に存在する天然の物質あるいは人工的に調製される任意の物質を意味する。該物質は、「ペプチド性物質」と「非ペプチド性物質」に大別することができる。

該「ペプチド性物質」としては、前記の詳述した本発明の抗体（好ましくはモ

ノクローナル抗体、特に好ましくは組換えヒト型モノクローナル抗体若しくはヒトモノクローナル抗体)、オリゴペプチドまたはそれらいずれかの化学修飾体を挙げることができる。オリゴペプチドとしては、5乃至30個のアミノ酸、好ましくは5乃至20個のアミノ酸からなるペプチドを挙げることができる。該化学修飾は、生体に投与された場合の血中半減期の増大あるいは経口投与時における消化管での分解に対する耐性若しくは吸収性の増大の目的等の種々の目的に応じて設計することができる。

該「非ペプチド性物質」としては、前述の<4>の発明の定義において詳述したアンチセンス医薬として有用な「部分塩基配列を含むDNAあるいはそれらを化学修飾した化学修飾DNA」、前述の<6>の発明の定義において詳述したアンチセンス医薬として有用な「部分塩基配列を含むRNAあるいはそれらを化学修飾した化学修飾RNA」あるいは化学的に合成された任意の「化合物」を挙げることができる。ここで、該「化合物」とは、DNA、RNA及び上記ペプチド性物質を除く化合物であって、分子量約100乃至約1000以下の化合物、好ましくは分子量約100乃至約800の化合物であり、より好ましくは分子量約100乃至約600の化合物を挙げることができる。

該本発明の同定方法により同定された物質としては、ヒト生体の任意の組織に発生するいずれかの腫瘍細胞の増殖を阻害する能力を有する物質であることが望ましい。該組織としては、例えば、脳、頸部、肝臓、脾臓、腎臓、大腸、小腸、十二指腸、前立腺、肺、胃、心臓、皮膚、骨髄、子宮、卵巣、精巣、口腔、舌、骨あるいは胸部などを挙げることができる。

本発明のさらに他の1つは、本発明のタンパクをコードする遺伝子のmRNAへの転写または本発明のタンパクの発現を阻害する能力を有する物質を同定する方法である。具体的には、例えば前記した下記のとおりの方法である。

「配列番号2又は4に記載のアミノ酸配列を有するタンパクをコードする遺伝子のmRNAへの転写若しくは配列番号2又は4に記載のアミノ酸配列を有するタンパクの発現を阻害する能力を有する物質を同定する方法であって、下記の工程を含むことを特徴とする方法：

(1) 下記 (a)、(b) 並びに (c) の DNA により共形質転換された細胞であって、該細胞は、該 (a) の DNA によりコードされる配列表番号 2 のアミノ酸配列を有するタンパクの発現に依存して、同時に該 (c) の DNA によりコードされるレポータータンパクを発現するように形質転換されていることを特徴とする細胞を、該物質の存在下または非存在下で培養する工程：

(a) 配列番号 1 又は 3 に記載の塩基配列の翻訳領域の塩基配列を含む DNA；

(b) 配列番号 5 又は 7 に記載の塩基配列の翻訳領域の塩基配列を含む DNA；

(c) レポータータンパクをコードする DNA；並びに

(2) 該物質の存在下で培養した細胞及び該物質の非存在下で培養した細胞の各々における該レポータータンパクの発現量を測定し、比較する工程。」

本方法は即ち、所謂レポータージェーンアッセイ (reporter gene assay) と総称される方法であり、具体的には、本発明のアミノ酸トランスポーター分子をコードする DNA、該 DNA の発現調節制御領域をコードする DNA、及び蛍光を発するレポータータンパク (蛍若しくはウミシイタケなどに由来するルシフェラーゼ、またはクラゲ由来の GFP (Green Fluorescence Protein) など) をコードする DNA を、該トランスポーター分子の発現に依存して該レポータータンパク分子が発現可能なように挿入した発現ベクターで、遺伝子組換えタンパクの製造で一般的に使用される細胞を形質転換することによって得られた形質転換細胞に、被験化合物を接触させ、該化合物の作用に依存して発現されるトランスポーター分子の量を、該分子の発現と同時に発現される該レポータータンパクが発する蛍光の量を測定することにより間接的に測定することにより、該化合物が、トランスポーター分子の発現に影響を与えるか否かを分析する方法である (例えば、米国特許第 5,436,128 号及び米国特許第 5,401,629 号を参照できる)。

また、本アッセイを用いた該化合物の同定は、マニュアル作業でも可能であるが、機械 (ロボット) を用いて自動で行う所謂ハイスループットスクリーニング (High Throughput Screening) (組織培養工学、Vol. 23, No. 13, p. 521-524；米国特許第 5,670,113 号) を用いることによりより迅速、簡便に行うことができる。

上記方法で用いられる「細胞」及び「物質」なる用語は、前記に定義したとおりの意味を有する。

### 実施例

以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明が該実施例に記載される態様のみに限定されるものではないことは言うまでもない。

なお、下記実施例において、各操作は特に明示がない限り、「Molecular cloning」(Sambrook, J., Fritsch, E. F. 及び Maniatis, T. 著、Cold Spring Harbor Press より 1989 に発刊) に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

#### 実施例 1 ヒト細胞膜表面分子 4F2hc の cDNA の単離と cRNA の調製

(1) ラット 4F2hc をコードする cDNA 断片の RT-PCR による調製

常法に従って、ラット肝臓から精製した poly(A)<sup>+</sup>RNA を調製した。また、ラット 4F2hc をコードする cDNA 配列 (Biochem. J., Vol. 312, p. 863, 1995) を基に、5' プライマー (配列番号 9) 及び 3' プライマー (配列番号 10) を合成した。

該 poly(A)<sup>+</sup>RNA を鋳型として、該 2 つのプライマー及び Taq ポリメラーゼ (TAKARA 製) を用いて RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction; 実験医学・増刊、「PCR とその応用」、第 8 巻、第 9 号、1990 年; 並びに「遺伝子増幅 PCR 法・基礎と新しい展開」、共立出版株式会社発行、1992 年) を行った。反応は、DNA サーマルサイクラー (Perkin Elmer Cetus 製) を用いて、該ポリメラーゼに添付のプロトコールに従って行った。

増幅された cDNA をアガロースゲル電気泳動した後、DNA 抽出キット (キアゲン製) を用いて精製し、ラット 4F2hc 遺伝子の断片 (配列番号 7 に記載の塩基配列の 34 乃至 479 番目) を取得した。

なお、ラット 4F2hc をコードする cDNA 配列及び対応するアミノ酸配列を、各々配列番号 7 及び配列番号 8 に記載した。

## (2) ヒト 4 F 2 h c をコードする c D N A の取得及び c R N A の調製

c D N A 合成用キット (商品名: Superscript Choice System、ギブコ社製) を使用し、該キットに添付の実験操作方法に従って、ヒト胎盤由来 p o l y (A) -R N A (Clontech製) からヒト c D N A を調製し、D N A リガーゼ (Gibco製) を用いて、該 c D N A をファージベクター  $\lambda$  Z i p L o x (Gibco社製) の制限酵素 E c o R I 切断部位に組み込みヒト c D N A ライブラリーを作製した。

前記 (1) で取得したラット 4 F 2 h c の遺伝子断片を  $^{32}$ P - d C T P でラベルしてプローブとしてブラークハイブリダイゼーション用のプローブとした。該プローブを用いて、前記で調製したヒト c D N A ライブラリーを下記のようにしてスクリーニングした。

該 c D N A ライブラリーを寒天プレートに蒔き、市販のフィルター膜を用いてレプリカを作製した。このレプリカと該放射性プローブを用いて、ハイブリダイゼーション溶液中で 37℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション用溶液としては、5 x S S C、3 x デンハード液 (Denhard's 液) 0.2% S D S、10% 硫酸デキストラン、50% ホルムアミド、0.01% A b t i f o r m B (消泡剤、シグマ社製)、0.2 mg/ml サーモン精子変性 D N A、2.5 mM ピロリン酸ナトリウム、及び 25 mM M E S を含む pH 6.5 の緩衝液を用いた。フィルター膜は、37℃で 0.1 x S S C / 0.1% S D S で洗浄した。

該ハイブリダーゼーションで選られた陽性クローンをシングルブラークで単離した後、in vivo excision に供し、プラスミド p Z L 1 (Gibco製) に組換えてプラスミド D N A として回収した。該プラスミド D N A をさらに p B l u e S c r i p t I I S K (-) (Stratagene製) にサブクローニングした。

得られたクローンに含まれるヒト 4 F 2 h c の c D N A の塩基配列を決定するため、7 種類のプライマーを合成した (配列番号 11 乃至配列番号 17)。該 7 種類の合成プライマー、並びに市販のユニバーサルプライマーである T7 プライマー及び S P 6 プライマー (Stratagene製) を用いて、ダイターミネーターサイクルシーケンシング法 (Applied Biosystems 社) により、c D N A の塩基配列を決定した。この結果、クローニングした c D N A がヒト 4 F 2 h c 遺伝子のもの



であることが確認できた。

なお、ヒト 4 F 2 h c をコードする c D N A 配列及び対応するアミノ酸配列を、各々配列番号 5 及び配列番号 6 に記載した。

上記より得られたヒト 4 F 2 h c の c D N A を含むプラスミドから、T 7 R N A ポリメラーゼ (Stratagene 製) を用いて常法に準じて c R N A (c D N A に相補的な R N A、配列番号 2 7) を調製した (実験医学増刊, 「バイオシグナル実験法」, Vol. 11, No. 3, p. 33-34, 1993)。

## 実施例 2 ヒトアミノ酸トランスポーター L A T 1 の c D N A の単離と c R N A の調製

c D N A 合成用キット (商品名: Superscript Choice System、ギブコ社製) を使用し、該キットに添付の実験操作方法に従って、ヒトテラトカルシノーマ細胞株 P A - 1 由来ポリ (A) <sup>+</sup> R N A (Clontech 社から購入) からヒト c D N A を調製し、D N A リガーゼ (Gibco 製) を用いて、該 c D N A をファージベクター  $\lambda$  Z i p L o x (Gibco 社製) の制限酵素 E c o R I 切断部位に組み込みヒト c D N A ライブラリーを作製した。

ラットアミノ酸トランスポーター L A T 1 をコードする c D N A (D D B J / E M B L / G e n B a n k 登録番号: A B 0 1 5 4 3 2、配列番号 3 の塩基番号 1 1 3 5 乃至 1 5 2 9 番目に相当するセグメント) を制限酵素 B a m H I によって切り出した。なお、ラットアミノ酸トランスポーター L A T 1 のアミノ酸配列を、配列番号 4 に記載した。

この D N A セグメントを <sup>32</sup>P - d C T P でラベルしてプローブとしてブランクハイブリダイゼーション用のプローブとした。

該プローブを用いて、前記で調製したヒト c D N A ライブラリーを下記のようにしてスクリーニングした。

該 c D N A ライブラリーを寒天プレートに蒔き、市販のフィルター膜を用いてレブリカを作製した。このレブリカと該放射性プローブを用いて、ハイブリダイゼーション溶液中で 3 7 ° C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション用溶液としては、5 x S S C、3 x デンハード液 (Denhard's 液) 0 .

2% SDS、10% 硫酸デキストラン、50% ホルムアミド、0.01% Abtiform B (消泡剤、シグマ社製)、0.2 mg/ml サーモン精子変性 DNA、2.5 mM ピロリン酸ナトリウム、及び 25 mM MES を含む pH 6.5 の緩衝液を用いた。フィルター膜は、37℃ で 0.1 x SSC / 0.1% SDS で洗浄した。

該ハイブリダーゼーションで選られた陽性クローンをシングルブランクで単離した後、in vivo excision に供し、プラスミド pZL1 (Stratagene 製) に組換えてプラスミド DNA として回収した。該プラスミド DNA を、制限酵素 Pst I で切断し、1.8 kb、2.5 kb 及び 4.3 kb の大きさを有する 3 つの cDNA 断片を得た。該 1.8 kb 及び 2.5 kb の断片は、各々 pBlueScript II SK (-) (Stratagene 製) にサブクローニングした。また、該 4.3 kb の cDNA 断片を自己ライゲーションさせた。

得られた該 3 つの cDNA 断片を有する各々のプラスミドに含まれるヒトアミノ酸トランスポーター LAT1 の cDNA の塩基配列を決定するため、8 種類のプライマーを合成した (配列番号 18 乃至配列番号 25)。該 8 種類の合成プライマー、並びに市販のユニバーサルプライマーである M13 フォワードプライマー及び M13 リバースプライマー (Stratagene 製) を用いて、ダイターミネーターサイクルシーケンシング法 (Applied Biosystems 社) により、cDNA の塩基配列を決定した。

得られたヒトアミノ酸トランスポーター LAT1 をコードする全長 cDNA の配列及び対応するアミノ酸配列を、各々配列番号 1 及び配列番号 2 に記載した。

さらに、得られたヒトアミノ酸トランスポーター LAT1 をコードする cDNA を含むプラスミドから、T3 RNA ポリメラーゼ (Stratagene 製) を用いて cRNA (配列番号 26、cDNA に相補的な RNA) を調製した。

ラットアミノ酸トランスポーター LAT1 及びヒトアミノ酸トランスポーター LAT1 の各々のアミノ酸配列の相同性を解析したところ、ヒト LAT1 は、ラット LAT1 と約 91% のアミノ酸相同を有していた。結果を、第 1 図に示す。

ヒトアミノ酸トランスポーター LAT1 のアミノ酸配列を疎水性プロット分析 (Kyte-Doolittle hydropathy analysis) により分析した結果、ヒト LAT1 は、

1 2 個の膜貫通領域 (membrane-spanning domain) を有する細胞膜表面分子であることが推定された。結果を第 2 図に示す。

### 実施例 3 ヒトの種々の組織におけるヒトアミノ酸トランスポーター LAT 1 の mRNA の発現の解析

ヒトアミノ酸トランスポーター LAT 1 をコードする cDNA (配列番号 1 の第 649 ~ 1128 番目の塩基に相当する cDNA 断片) を制限酵素 Sma I で切り出し、 $^{32}\text{P}$ -dCTP でラベルしてハイブリダイゼーションプローブとした。該プローブを用いて、ヒトの種々組織に対するノーザンブロッティングを以下のようにして行った。

ヒト poly (A)<sup>+</sup>RNA をブロッティングしたナイロンメンブラン (商品名: MTN Blot; Clontech 製) を、該キットに添付のプロトコールに従い、該  $^{32}\text{P}$ -dCTP 標識ヒト LAT 1 プローブを用いてハイブリダイゼーション並びに洗浄を行った。結果を第 3 図 (分図 (a) 乃至 (c)) 。

この結果、胎盤、脳、精巣、骨髓、及び胎児肝臓において約 4.8 kb の大きさを有するヒト LAT 1 の mRNA の発現が認められた。また、末梢血白血球においても弱い mRNA の発現が認められた。

### 実施例 4 ヒトアミノ酸トランスポーター LAT 1 の生物活性の解析

#### (1) 細胞内へのアミノ酸の輸送を媒介する能力の解析

腫瘍細胞の増殖に関するこれまでの研究から、タイプ II 膜糖タンパクに分類される重鎖と軽鎖とのヘテロダイマーである 4F2 (CD98) と命名された既知の細胞膜表面抗原の重鎖 (heavy chain; 4F2hc) が、未だ同定されていないアミノ酸トランスポーターを活性化において重要な役割を担うのではないかと考えられてきている (J. Immunol., Vol. 126, p. 1409-1414, 1981; J. Immunol., Vol. 129, p. 623-628, 1982; Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 84, p. 6526-6530, 1987; Cancer Res., Vol. 46, p. 1478-1484, 1986; J. Biol. Chem., Vol. 267, p. 15285-15288, 1992; Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 89, p. 5606 - 5610, 1992; Biochem. J., Vol. 324, p. 535-541, 1997; 及び J. Exp. Biol., Vol. 196,

p. 123-137, 1994)。

従って、本発明のアミノ酸トランスポーターLAT1が、細胞内へのアミノ酸の輸送を担うか否かを、ヒトLAT1のみを発現させた細胞と、ヒトLAT1及びヒト4F2hcを共に発現する細胞とも用いて、各々の細胞におけるロイシン(中性アミノ酸)の取り込み量を測定することにより分析した。

なお、本試験は、種々物質の細胞内への取り込み試験で汎用されるアフリカツメガエルの卵母細胞を用いる方法を原理とする(実験医学増刊、「バイオシグナル実験法」, Vol. 11, No. 3, p. 30-38, 1993)。

前記実施例で調製したヒトLAT1をコードするcRNA(25 ng)単独、前記実施例で調製したヒト4F2hcをコードするcRNA(25 ng)単独、またはヒトLAT1をコードするcRNA(17.5 ng)及びヒト4F2hcをコードするcRNA(7.5 ng)を、アフリカツメガエルの卵母細胞に注入して2日間あるいは5日間培養することにより、ヒトLAT1のみを発現する卵母細胞、ヒト4F2hcのみを発現する卵母細胞、並びにヒトLAT1及びヒト4F2hcを共発現する卵母細胞を調製した。

基質として<sup>14</sup>C放射性標識した放射性標識ロイシンを用い、各々の卵母細胞における該標識ロイシンの取り込みを、金井らの方法(Kanai and Hediger, Nature, 第360巻、467-471頁、1992年)に準じて、以下のように行った。

具体的には、各々の卵母細胞を、<sup>14</sup>C標識ロイシン(50  $\mu$ M)を含む塩化コリン取り込み溶液(100 mM 塩化コリン、2 mM 塩化カリウム、1.8 mM 塩化カルシウム、1 mM 塩化マグネシウム及び5 mM HEPESかならる。pH 7.4)中で30分間培養することにより、細胞内に取り込まれた<sup>14</sup>C標識ロイシンの量を、該細胞が有する放射活性をシンチレーションカウンターで測定することにより求めた。なお、対照として、前記のいずれのRNAも注入せず水のみを注入した卵母細胞を用いて同様に実験を行った。結果を第4図に示す。

この結果、ヒトLAT1のみを発現させた卵母細胞では、対照として水を注入した卵母細胞と同じく、ロイシンの取り込みがほとんど見られなかったが、ヒトLAT1とヒト4F2hcを共に発現させた卵母細胞では大きなロイシンの取り込みが確認された。この結果は、ヒトアミノ酸トランスポーターLAT1がアミ

ノ酸の取り込みを媒介する機能を発揮するためには、ヒト4F2hcが必要であると考えられた。

## (2) 細胞内へのアミノ酸の輸送の塩依存性の解析

ヒトアミノ酸トランスポーターLAT1が細胞内へのアミノ酸の輸送を媒介する能力の塩依存性の有無下記のようにして解析した。具体的には、前記実施例4(1)において卵母細胞を培養する取り込み溶液 (uptake solution) の種類を変えることによって起こるロイシンの細胞内への取り込み量の変化を観察することにより解析した。

実施例4(1)で調製したヒトLAT1及びヒト4F2hcを共発現するアフリカツメガエル卵母細胞を、前述の $^{14}\text{C}$ 標識ロイシン ( $50\mu\text{M}$ ) を含む塩化コリン取り込み溶液、 $^{14}\text{C}$ 標識ロイシン ( $50\mu\text{M}$ ) を含むナトリウム取り込み溶液 (前述のコリン取り込み溶液の $100\text{mM}$  塩化コリンを $100\text{mM}$  塩化ナトリウムに変えたもの)、または $^{14}\text{C}$ 標識ロイシン ( $50\mu\text{M}$ ) を含むグルコン酸取り込み溶液 (該ナトリウム取り込み溶液の $100\text{mM}$  塩化ナトリウムを $100\text{mM}$  グルコン酸ナトリウムに変えたもの) 中で30分間培養した。

細胞内に取り込まれた $^{14}\text{C}$ 標識ロイシンの量を、該細胞が有する放射活性をシンチレーションカウンターで測定することにより求めた。結果を第5図に示す。

この結果、細胞外のコリンをナトリウムに変えても、また細胞外の塩素イオンをグルコン酸イオンに変えても、細胞内へのロイシン取り込みには何ら影響を与えなかった。このことから、ヒトアミノ酸トランスポーターLAT1は、ナトリウムイオン及び塩素イオンに非依存性に働くトランスポーター分子であることが示された。

## (3) ヒトアミノ酸トランスポーターLAT1の基質への親和性

ヒトアミノ酸トランスポーターLAT1の基質への親和性を解析するために、ミカエリス-メンテン動力学試験 (生化学辞典、第2版、1307-1308、第4刷、1992) を行った。

本動力学的試験は、基質としてのロイシンの濃度の違い依存するロイシン取り込み率の変化を調べることにより行った。

ロイシンの取り込み実験は、ヒトLAT1及びヒト4F2hcを共発現するア

フリカツメガエル卵母細胞を用い、前記実施例 4 (1) に記載の方法に準じて実施した。結果を第 6 図に示す。

この結果、ミカエリス定数 ( $K_m$ ) は、約  $2.1 \mu M$  であった。

(4) ヒトアミノ酸トランスポーター LAT 1 の基質特異性の解析 (その 1)

ヒトアミノ酸トランスポーター LAT 1 の基質特異性 (LAT 1 を介して細胞内に取り込まれる基質の種類) を、競合的拮抗試験により解析した。

具体的には、ヒト LAT 1 及びヒト 4F2hc を共発現するアフリカツメガエル卵母細胞を、被験物質 (種々のアミノ酸、薬剤、生理活性物質あるいは他の低分子合成化合物) の存在下で培養した場合の該細胞内への基質としての  $^{14}C$  標識ロイシンの取り込み量の変化を測定することにより解析した。被験物質を加えない場合の対照と比べ、 $^{14}C$  標識ロイシンの取り込み量が減少した場合には、該被験物質は、ヒトアミノ酸トランスポーター LAT 1 を介して細胞内に取り込まれることが示される。

実施例 4 (1) で調製したヒト LAT 1 及びヒト 4F2hc を共発現するアフリカツメガエル卵母細胞を、 $^{14}C$  標識ロイシン ( $20 \mu M$ ) 及び下記のいずれかの被験物質 ( $2 mM$ ) を含む塩化コリン取り込み溶液中で 30 分間培養した。

なお、対照としていずれの被験物質をも含まない  $^{14}C$  標識ロイシン含有コリン取り込み溶液中での培養を同様にして行った。

[被験物質]

グリシン、アラニン、セリン、スレオニン、システイン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、チロシン、ヒスチジン、トリプトファン、バリン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニン、プロリン、及び BCH (2-amino-2-norbornane-carboxylic acid)。

細胞内に取り込まれた  $^{14}C$  標識ロイシンの量を、該細胞が有する放射活性をシンチレーションカウンターで測定することにより求めた。結果を第 7 図に示す。

さらに、前記  $^{14}C$  標識ロイシンの代わりに、 $^{14}C$  標識フェニルアラニンを用いて、前述の方法に準じて下記被験物質の細胞内への取り込みを調べた。なお、対照として、いずれの被験物質をも含まない  $^{14}C$  標識フェニルアラニン含有コリン取り込み溶液中での培養を同様にして行った。

## 〔被験物質〕

L-DOPA（パーキンソン病治療薬）及びトリヨードサイロニン（甲状腺ホルモン）。

結果を第8図及び第9図に示す。

その結果、各種のアミノ酸、薬剤及び生理活性物質等で、 $^{14}\text{C}$ 標識ロイシンまたは $^{14}\text{C}$ 標識フェニルアラニンの細胞内への取り込みのcis-阻害効果が観察された。特に、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、チロシン、ヒスチジン、トリプトファン、バリンはヒトLAT1を介した $^{14}\text{C}$ 標識ロイシンの取り込みを強く阻害したことから、該いずれのアミノ酸もがヒトLAT1を介して細胞内に輸送されることが強く示唆された。また、中性アミノ酸取り込み阻害薬として知られていた2-amino-2-norbornane-carboxylic acid (BCH)も、 $^{14}\text{C}$ 標識ロイシンの取り込みを阻害した。また、 $^{14}\text{C}$ 標識フェニルアラニンの細胞内への取り込みが、L-DOPA（パーキンソン病治療薬）などの薬物、トリヨードサイロニン（甲状腺ホルモン）などの生理活性物質によって強く阻害された。一方、被験物質として酸性アミノ酸（グルタミン酸、アスパラギン酸）または塩基性アミノ酸（リジン、アルギニン）を用いた場合には、ヒトLAT1を介した $^{14}\text{C}$ 標識ロイシンの取り込みに何ら影響を与えなかった。

この結果は、ヒトアミノ酸トランスポーターLAT1は、種々のアミノ酸（特に中性あるいは中性に近いアミノ酸）、種々の薬剤、種々の生理活性物質、並びに他の低分子合成化合物等の細胞内への輸送を媒介することを強く示唆するものである。

## （5）ヒトアミノ酸トランスポーターLAT1の基質特異性の解析（その2）

実施例4（4）での知見を基に、ヒトLAT1を介したロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、チロシン、ヒスチジン、トリプトファン及びバリンの細胞内への取り込みの有無を解析した。

本試験は、 $^{14}\text{C}$ 標識ロイシンの代わりに、上記各々のアミノ酸を $^{14}\text{C}$ で標識した下記の $^{14}\text{C}$ 標識アミノ酸を基質として用い、実施例2（1）と同様にして行った。

〔 $^{14}\text{C}$ 標識アミノ酸〕

$^{14}\text{C}$  標識ロイシン、 $^{14}\text{C}$  標識イソロイシン、 $^{14}\text{C}$  標識フェニルアラニン、 $^{14}\text{C}$  標識メチオニン、 $^{14}\text{C}$  標識チロシン、 $^{14}\text{C}$  標識ヒスチジン、 $^{14}\text{C}$  標識トリプトファン、または $^{14}\text{C}$  標識バリン。

なお、比較のために、 $^{14}\text{C}$  標識グリシン、 $^{14}\text{C}$  標識セリン、 $^{14}\text{C}$  標識D-ロイシン、及び $^{14}\text{C}$  標識D-フェニルアラニンについても同様にして試験した。結果を第10図に示す。

この結果、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、チロシン、ヒスチジン、トリプトファン及びバリンが、卵母細胞へ有意に取り込まれることが確認された。

#### 実施例5 各種ヒト由来腫瘍細胞におけるヒトアミノ酸トランスポーターLAT1のmRNAの発現の解析

ヒト由来の各種腫瘍細胞から、ISOGEN（商品名：ニッポンジーン製）を用いて、常法により全RNAを取得し、該RNAを常法に従いアガロース電気泳動に供し、ニトロセルロースメンブレンにブロッティングする。

実施例3で調製したヒトアミノ酸トランスポーターLAT1をコードするcDNA断片を $^{32}\text{P}$ -dCTPでラベルして作製したハイブリダイゼーションプローブを用いて、ノーザンブロッティングを行う。該ノーザンブロッティングは、種々のpoly(A)<sup>+</sup>RNAがブロッティングされている市販のノーザンブロッティング用ナイロンメンブレン（例えば、商品名：MTN Blot: Clontech製）に添付のプロトコールに準じて行う。

本ノーザンブロッティングにより、ヒト由来の種々の腫瘍細胞でのヒトLAT1をコードするmRNAの発現を確認することができる。

#### 実施例6（ラット中性アミノ酸トランスポーターのクローニング）

##### （1）ラット4F2hcのcDNAの単離とcRNAの調製

cDNAライブラリーはラット肝から精製したポリ(A)<sup>+</sup>RNAから、cDNA合成用キット（商品名：Superscript Choice System、ギブコ社製）を使用して作成し、ファージベクターλZipLox（ギブコ



社製)の制限酵素EcoRI切断部位に組み込んだ。PCR法にて、ラット4F2hc遺伝子(Broerら、Biochem. J.、第312巻、863項、1995年)の第135~580番目の塩基に相当するセグメントを増幅し、これを<sup>32</sup>P-dCTPでラベルしてプローブとして用いて、ラット肝cDNAライブラリーをスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、37℃のハイブリダイゼーション用溶液中で一晩行い、フィルター膜は、37℃で0.1xSSC/0.1%SDSで洗浄した。ハイブリダイゼーション用溶液としては、5xSSC、3xデンハード液(Denhard's液)0.2%SDS、10%硫酸デキストラン、50%ホルムアミド、0.01%Abtiform B(商品名、シグマ社)(消泡剤)、0.2mg/mlサーモン精子変性DNA、2.5mMピロリン酸ナトリウム、25mM MESを含むpH6.5の緩衝液を用いた。cDNAを組み込んだλZipLoxファージのcDNA部分を、プラスミドpZL1に組み込み、さらにプラスミドpBluescriptISK- (Stratagene社製)へサブクローン化した。

得られたクローンすなわち、ラット4F2hcのcDNAを含むクローンについて、塩基配列決定のための合成プライマー、塩基配列決定用キット(商品名: Sequenase ver. 2.0、アマシャム社製)を用いてダイデオキシ法により、cDNAの塩基配列を決定した。これにより、クローニングしたcDNAがラット4F2hc遺伝子のものであることが確認できた。得られた4F2hcの塩基配列を後記配列表の配列番号2に示した。

上記より得られたラット4F2hcのcDNAを含むプラスミドから、T7 RNAポリメラーゼを用いて、cRNA(cDNAに相補的なRNA)調製した。

## (2) ラット中性アミノ酸トランスポーターLAT1のクローニング

金井らの方法(Kanai and Hediger、Nature、第360巻、467~471頁、1992年)に準じて、発現クローニング法により、以下のようにして行った。

ゲル電気泳動によりラットC6グリオーマ細胞ポリ(A)<sup>+</sup>RNA400μgを分画した。

分画により得られた各画分を、上記(1)で得られたラット4F2hcのcR

NAと共に卵母細胞に注入し、2日間培養した。

RNAを注入した卵母細胞について、基質としてロイシンを用い、基質の取り込み実験を金井らの方法 (Kanai and Hediger, Nature, 第360巻、467~471頁、1992年) に準じて、以下のように行った。基質として<sup>14</sup>C-ロイシン (50  $\mu$ M) を含む塩化コリン取り込み用溶液 (uptake solution) (100mM塩化コリン、2mM塩化カリウム、1.8mM塩化カルシウム、1mM塩化マグネシウム、5mM HEPES、pH 7.4) 中にて30分卵母細胞を培養して、細胞内に取り込まれた放射能のカウントで基質の取り込み率を測定した。なお、この系において、ラットC6グリオーマ細胞ポリ(A)<sup>+</sup>RNA (mRNA) とラット4F2hcのcRNAを共に注入した卵母細胞は、それぞれを単独で注入した卵母細胞に比し、相乗的な取り込み亢進が見られることを確認した (第11図)。

分画により得られた各RNA画分のうち、RNAを注入した卵母細胞が、最も高いロイシンの取り込み率を示した画分を選択した。この画分のポリ(A)<sup>+</sup>RNA (2.8~4.0kb) について、cDNA合成及びプラスミドクローニング用キット (商品名: Superscript Plasmid System、ギブコ社製) を使用して、cDNAライブラリーを作成した。これらDNAはプラスミドpSPORT1 (ギブコ社製) の制限酵素SalI及びNotI認識部位に組み込み、得られた組み換えプラスミドDNAを大腸菌DH10B株のコンピテントセル (商品名: Electro Max DH10B Competent cell、ギブコ社製) に導入した。得られた形質転換体をニトロセルロース膜上で培養し、1プレート当たり約500個のコロニーが得られた。これらコロニーから、プラスミドDNAを調製し、これらを制限酵素NotIで切断した。得られたDNAを用いて、in vitro転写により、キャップ化されたcRNAを合成した。

得られたcRNA (約45ng) を、上記(1)で得られたラット4F2hcのcRNA (5ng) と共に卵母細胞へ注入した。これら卵母細胞について、前記と同様にして、ロイシン取り込み実験を行うことにより陽性クローンのスクリーニングを行った。スクリーニングに際しては、複数のクローンから抽出したD

NAをブールしたグループについて調べ、あるグループでロイシン取り込みが確認された場合、さらにそれを複数のグループに分割し、さらにスクリーニングを行った。

得られたクローン、すなわち、ラット中性アミノ酸トランスポーターLAT1のcDNAを含むクローンについて、基配列決定のための合成プライマー、塩基配列決定用キット（商品名：Sequenase ver. 2.0、アマシャム社製）を用いてダイデオキシ法により、cDNAの塩基配列を決定した。

これにより、ラット中性アミノ酸トランスポーターLAT1遺伝子の塩基配列が得られた。また、cDNAの塩基配列を常法により解析して、cDNAの翻訳領域とそこにコードされるLAT1のアミノ酸配列を決定した。翻訳領域は第64-1599塩基である。

これらの配列を、後記配列表の配列番号4（アミノ酸配列）及び3（塩基配列）に示した。

Kyte-Doolittle hydrophathy analysis（疎水性プロット）により、LAT1のアミノ酸配列を解析した結果、第12図に示したように、12個の膜貫通領域（membrane-spanning domain）が予想された。また、第2の親水性ループにチロシンリン酸化部位、第4と第8の親水性ループにプロテインキナーゼC依存性のリン酸化部位と考えられる部位が2つあった。

（3）ラットの種々の組織及びラット培養細胞株におけるLAT1遺伝子の発現（ノーザンブロッティングによる解析）

ラットLAT1遺伝子の第202～1534番目の塩基に相当するcDNA断片を $^{32}\text{P}$ -dCTPでラベルし、これをプローブとして用いて、ラットの種々の組織及びラット由来の培養腫瘍細胞株から抽出したRNAに対してノーザンブロッティングを以下のようにして行った。3 $\mu\text{g}$ のポリ(A) $^{+}$ RNAを1%アガロース/ホルムアルデヒドゲルで電気泳動したのち、ニトロセルロースフィルターにトランスファーした。このフィルターを42℃で、 $^{32}\text{P}$ -dCTPでラベルしたLAT1 cDNA断片を含んだハイブリダイゼーション液で1晩ハイブリダイゼーションを行った。フィルターを、65℃にて、0.1% SDSを含む0.

1 x S S C で洗淨した。

ノーザンブロッティングの結果（第 13 図）、C6 グリオーマ細胞、胎盤、脳、脾臓、大腸、精巣において 3.8 kb 付近に、胎盤ではそれに加えて 2.6 kb 付近にバンドが検出され、発現が認められた。また、正常肝では発現は極めて弱い、形質転換したラット肝細胞株、肝細胞癌細胞株においても 3.8 kb 付近に強いバンドが検出され、発現が認められた（第 14 図）。

さらに長時間感光で、その他の組織においても、3.8 kb 付近にかすかなバンドが検出された。

（4）ヒト腫瘍細胞株における LAT 1 遺伝子の発現（ノーザンブロッティングによる解析）

ラット LAT 1 遺伝子の第 202 ~ 1534 番目の塩基に相当する cDNA 断片を  $^{32}\text{P}$ -dCTP でラベルし、これをプローブとして用いて、ヒト由来の培養腫瘍細胞株から抽出した RNA に対してノーザンブロッティングを以下のようにして行った。3  $\mu\text{g}$  のポリ (A)  $^{+}$  RNA を 1 % アガロース/ホルムアルデヒドゲルで電気泳動したのち、ニトロセルロースフィルターにトランスファーした。このフィルターを 37 °C で、 $^{32}\text{P}$ -dCTP でラベルしたラット LAT 1 cDNA 断片を含んだハイブリダイゼーション液で 1 晩ハイブリダイゼーションを行った。フィルターを、37 °C にて、0.1 % SDS を含む 0.1 x S S C で洗淨した。

ノーザンブロッティングの結果（第 15 図）、胃印環細胞癌細胞株、肺小細胞癌細胞株、黒色腫細胞株に 4.0 kb の強いバンド、神経芽細胞腫細胞株に 4.0 kb の弱いバンドが検出され、発現が認められた。

#### 実施例 7（中性アミノ酸トランスポーター LAT 1 の特徴づけ）

##### （1）LAT 1 の輸送活性における 4F2hc の役割

ラット LAT 1 遺伝子 cRNA を単独で卵母細胞に発現させた場合と、ラット LAT 1 遺伝子 cRNA と 4F2hc 遺伝子 cRNA を共に卵母細胞に発現させた場合のロイシン取り込み活性を比較した。

ラット LAT 1 遺伝子 cRNA 25 ng、ラット 4F2hc 遺伝子 cRNA 25 ng、もしくはラット LAT 1 遺伝子 cRNA 12.5 ng / ラット 4F2h

c 遺伝子 cRNA 12.5 ng を、卵母細胞に注入することによって発現させ、2 日間あるいは 5 日間培養した。

ロイシンの取り込み実験は、前記実施例 6 (2) 記載方法に準じ、以下のように行った。すなわち、ラット LAT1 遺伝子 cRNA、ラット 4F2hc 遺伝子 cRNA、もしくはラット LAT1 遺伝子 cRNA とラット 4F2hc 遺伝子 cRNA を注入した卵母細胞を、 $^{14}\text{C}$ -ロイシン ( $50\text{ }\mu\text{M}$ ) を含む取り込み用溶液中にて 30 分培養して、細胞内への放射能の取り込みを測定した。

その結果 (第 16 図)、ロイシンの取り込みは、LAT1 のみを発現させた卵母細胞では、対照として水を注入した卵母細胞と同レベルであったが、LAT1 と 4F2hc を共に発現させた卵母細胞ではおおきなロイシンの取り込みを示しており、LAT1 が機能を発揮するためには、4F2hc が必要であると考えられた。

#### (2) LAT1 の輸送活性の塩依存性

ラット LAT1 遺伝子 cRNA と 4F2hc 遺伝子 cRNA を共に卵母細胞によるロイシン取り込み実験において培地に添加する塩の影響を調べた。

ロイシンの取り込み実験は、ラット LAT1 遺伝子 cRNA とラット 4F2hc 遺伝子 cRNA を共に注入した卵母細胞を用い、前記実施例 6 (2) 記載方法に準じて実施した。但し、取り込み用溶液は、ナトリウムイオンの影響をみる場合は、塩化コリン取り込み用溶液にかえて、ナトリウム取り込み用溶液 ( $100\text{ mM}$  塩化コリンを  $100\text{ mM}$  塩化ナトリウムに変えたもの) を用いた。塩素イオンの影響をみる場合は、ナトリウム取り込み用溶液にかえて、グルコン酸取り込み用溶液 ( $100\text{ mM}$  塩化ナトリウムを  $100\text{ mM}$  グルコン酸ナトリウムに変えたもの) を用いた。

その結果 (第 17 図)、細胞外のコリンをナトリウムに変えても、細胞外の塩素イオンをグルコン酸イオンに変えても、ロイシン取り込みに何ら影響を与えなかった。このことから、LAT1 はナトリウムイオン及び塩素イオンに非依存性に働くトランスポーターであることが示された。

#### (3) LAT1 のミカエリス-メンテン動力学試験

中性アミノ酸トランスポーターのミカエリス-メンテン動力学試験を行った。

基質ロイシンの濃度の違いによるロイシン取り込み率の変化を調べることにより、中性アミノ酸トランスポーターのミカエリス-メンテン動力学試験を行った。

ロイシンの取り込み実験は、ラットLAT1遺伝子cRNAとラット4F2hc遺伝子cRNAを共に注入した卵母細胞を用い、前記実施例6(2)記載方法に準じて実施した。その結果(第18図)、Km値は約24  $\mu$ Mであった。

(4) LAT1の基質選択性(アミノ酸及びその類似物質添加による阻害実験)

ラットLAT1遺伝子cRNAとラット4F2hc遺伝子cRNAを共に注入した卵母細胞によるロイシンの取り込み実験において、系への各種アミノ酸及びその類似物質添加の影響を調べた。

ロイシンの取り込み実験は、ラットLAT1遺伝子cRNAとラット4F2hc遺伝子cRNAを共に注入した卵母細胞を用い、前記実施例6(2)記載方法に準じて実施した。但し、コリン取り込み用溶液を用い、2mMの各種化合物(非標識)の存在下及び非存在下で、 $^{14}$ C-ロイシン(20  $\mu$ M)の取り込みを測定した。

その結果(第19図)、各種の中性アミノ酸で、cis-阻害効果が観察された。特に、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、チロシン、ヒスチジン、トリプトファン、バリンはLAT1を介した $^{14}$ C-ロイシンの取り込みを強く阻害した。また、標準アミノ酸以外の物質でも、L-DOPA(パーキンソン病治療薬)、メルファラン(melphalan)(抗腫瘍薬)、トリヨードサイロニン(甲状腺ホルモン)、サイロキシシン(甲状腺ホルモン)などの薬物や生理活性物質もLAT1を介した $^{14}$ C-ロイシンの取り込みを阻害した。さらに中性アミノ酸取り込み阻害薬として知られていた2-アミノ-2-ノルボルナン-カルボン酸(2-amino-2-norbornane-carboxylic acid)(BCH)もLAT1を介した $^{14}$ C-ロイシンの取り込みを阻害した。酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸は、LAT1を介した $^{14}$ C-ロイシンの取り込みに影響を与えなかった。

(5) LAT1の基質選択性(各種アミノ酸及びその類似物質を基質とする取り込み試験)

各種アミノ酸及びその類似物質を基質として、LAT1による取り込みを調べ

た。

各種アミノ酸及びその類似物質の取り込み実験は、ラットLAT1遺伝子cRNAとラット4F2hc遺伝子cRNAを共に注入した卵母細胞を用い、前記実施例6(2)記載方法に準じて実施した。但し、基質としては、 $^{14}\text{C}$ -ロイシンに変えて、放射能ラベルされた各種の化合物を用いた。

その結果、ロイシン( $^{14}\text{C}$ 化合物)、イソロイシン( $^{14}\text{C}$ 化合物)、フェニルアラニン( $^{14}\text{C}$ 化合物)、メチオニン( $^{14}\text{C}$ 化合物)、チロシン( $^{14}\text{C}$ 化合物)、ヒスチジン( $^{14}\text{C}$ 化合物)、トリプトファン( $^{14}\text{C}$ 化合物)、バリン( $^{14}\text{C}$ 化合物)を基質とした場合に、卵母細胞への取り込みが認められた。

実施例8 中性アミノ酸トランスポーターLAT1の抑制による細胞増殖の制御

(1) LAT1抑制の細胞増殖抑制効果

LAT1抑制薬によるLAT1抑制の細胞増殖に対する抑制効果を調べた。

LAT1を高発現するラット肝細胞株をWilliam's培地で培養し、LAT1を介する取り込みを阻害するD-ロイシンもしくはBCHを2.0mM培地に添加し、48時間培養後、細胞数をCell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories 社製)を用いて検討した。細胞数は、450nmにおける吸収(O.D. 450)として測定した。

その結果(第20図)、D-ロイシンもしくはBCHを添加した群は、D-ロイシンもしくはBCHを添加しない対照群に比較して、細胞数に低下が認められ、LAT1抑制による中性アミノ酸取り込み阻害により、細胞増殖が抑制されたと考えられた。

実施例9 ヒトの種々の腫瘍細胞株におけるLAT1遺伝子及び4F2hc遺伝子の発現(ノーザンブロッティングによる解析)

hLAT1 遺伝子の第649~1128番目の塩基に相当するcDNA断片を制限酵素Sma Iで切り出し、 $^{32}\text{P}$ -dCTP でラベルしてプローブとして、ヒト腫瘍細胞株に対するノーザンブロッティングを以下のようにして行った。ヒト各種腫瘍細胞株からpoly(A)<sup>+</sup>RNA抽出し、 $^{32}\text{P}$ -dCTP ラベルL

A T 1 プローブによるハイブリダイゼーション及び洗浄を行った。

h 4 F 2 h c 遺伝子の第 1 0 6 - 6 4 5 番目の塩基に相当する c D N A 断片を制限酵素 P s t I で切り出し、 $^{32}$ P - d C T P でラベルしてプローブとして、ヒト腫瘍細胞株に対するノーザンブロッティングを同様にして行った。

ノーザンブロッティングの結果、第 2 1 図及び第 2 2 図に示す検討したすべての腫瘍細胞株において 4 . 8 k b 付近に、L A T 1 の発現が認められた。4 F 2 h c に関しては、ほとんどの腫瘍細胞株で 2 . 2 k b 付近に発現が認められたが、発現に細胞よる強弱があり、特に白血病細胞株 D a u d i、C C R F - S B、P 3 0 / O H K では、ノーザンブロッティングによるシグナルは検出されなかった (第 2 2 図)。

実施例 1 0 L A T 1 阻害薬評価系としてのヒト膀胱癌由来 T 2 4 細胞の意義

ヒト膀胱癌由来 T 2 4 細胞は、1 0 % 牛胎児血清を含んだ Eagle's minimal essential medium 中で培養維持した。T 2 4 細胞へのアミノ酸取り込み試験は、T 2 4 細胞を 2 4 穴プレートに培養し、confluent に達した状態で行った。アミノ酸取り込み試験は、培養液を取り除き、 $^{14}$ C - アミノ酸を含む Dulbecco's P B S (Gibco 社製) を添加することにより開始し、それを取り除き氷冷、Dulbecco's P B S により洗浄することにより終了した。洗浄後、0 . 1 N N a O H で溶解し、液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。

( 1 ) T 2 4 細胞のロイシン取り込みの N a <sup>+</sup> 依存性

T 2 4 細胞によるロイシン取り込み実験において培地のナトリウムイオンの影響を調べた。

取り込み用溶液は、ロイシンの取り込みに対する培地のナトリウムイオンの影響を見る場合は、Dulbecco's P B S にかえて、コリン uptake solution (塩化ナトリウムを塩化コリンで置換したもの) を用いた。

その結果 (第 2 3 図)、細胞外のコリンをナトリウムに変えても、ロイシンの取り込みに何ら影響を与えなかった。このことから、T 2 4 細胞のロイシンの取り込みはナトリウムイオンに依存しない輸送系に担われていることが示された。

( 2 ) T 2 4 細胞のロイシン取り込みのミカエリス-メンテン動力学試験



T24細胞のロイシン取り込みのミカエリス-メンテン動力学試験を行った。基質ロイシンの濃度の違いによるロイシン取り込み率の変化を調べることにより、ミカエリス-メンテン動力学試験を行った。

その結果（第24図）、 $K_m$ 値は100.3 mM、 $V_{max}$ 値は23,870 pmol/mg protein/minであった。

(3) T24細胞のロイシン取り込みのアミノ酸及びその類似物質添加による阻害実験

T24細胞によるロイシンの取り込み実験において、系への各種アミノ酸及びその類似物質添加の影響を調べた。

ロイシンの取り込み実験において、2 mM の各種化合物（非標識）の存在下及び非存在下で、 $^{14}C$ -ロイシン（20 mM）の取り込みを測定した。

その結果（第25図）、メチニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン及びシステインで、強い competitive 阻害効果が観察された。アミノ酸輸送系 L 特異的阻害薬 BCH は、ロイシン取り込みを強く阻害した。この阻害実験の結果は、Xenopus 卵母細胞に LAT1 を発現させた場合の結果と一致する。

(4) T24細胞のロイシン取り込みの取り込み阻害薬 BCH による阻害様式

T24細胞の $^{14}C$ -ロイシン取り込みの濃度依存性を、BCHの非存在下、BCH 50 mM 存在下、BCH 100 mM 存在下で測定し、二重逆数プロットを用いて阻害様式を検討した。

その結果（第26図）、BCHによる阻害は競合阻害であることが明かになり、その $K_i$ 値は、156 mMであった。

実施例 11 ヒト腫瘍細胞株増殖へのアミノ酸取り込み阻害薬 BCH の効果

ヒト膀胱癌由来 T24 細胞は、10%牛胎児血清を含んだ Eagle's minimal essential medium 中で培養維持した。ヒト Daudi 細胞は、20%牛胎児血清を含んだ RPMI 培地で培養維持した。T24細胞あるいは Daudi 細胞を24穴プレートで（800/well）、20 mM BCH 添加した培地中あるいは添加しない培地中で5日間培養し、細胞数を計測した。

その結果（第27図）、T24細胞はDauidi細胞に比し、細胞増殖が急速であること、及びBCHはT24の増殖を高度に抑制するが、Dauidi細胞に対しては増殖抑制効果をほとんど示さないことが明かになった。

T24細胞はLAT1、4F2hcともに強発現しており（第21図）、実施例10で示されるようにT24細胞においてはLAT1は強い機能活性を示す。それに対して、Dauidi細胞においては、LAT1は強く発現するもののLAT1の機能発現に必要な4F2hcの発現は検出されず（第22図）、従ってDauidi細胞においては、LAT1は機能していないと考えられる。LAT1の機能活性の強いT24細胞の増殖が速く、BCHが高度な細胞増殖抑制を示し、LAT1が機能していないと考えられるDauidi細胞の増殖が遅く、BCHが増殖抑制効果を示さないことは、LAT1を介する必須アミノ酸取り込みが細胞増殖のひとつの律速段階を形成し、その抑制が細胞増殖抑制を示すという仮説を支持するものである。

Dauidi細胞と同様に4F2hcの発現が検出されないCCRF-SB細胞、P30/OHK細胞（第22図）においては、Dauidi細胞と同様に増殖が遅く、BCHの効果は弱く、T24細胞と同様LAT1と4F2hcが共に強発現する細胞では増殖が速く、BCHが強い抑制効果を示すことが確認された。

#### 実施例13 腫瘍接種マウスにおけるアミノ酸トランスポーター抑制薬BCHの延命効果

オスICRマウスにマウスsarcoma180細胞を腹腔内移植（ $1 \times 10^6$ ）し、移植翌日よりアミノ酸トランスポーター抑制薬BCH、アミノ酸トランスポーター抑制効果のあるD-Leu、及び抑制効果の無いD-Alaを300mg/kgの用量で10日間投与した。移植後毎日マウスの生死を確認した。

19日間の観察の結果、未処理の対照では全例生存したが、sarcoma180細胞接種群、sarcoma180細胞接種群及びsarcoma180細胞接種後ビヒクル投与群では対照に比べて、有意に生存期間が短縮された（第28図）。これに対して、sarcoma180細胞接種後、BCHを投与した群、D-Leuを投与した群では、それらの薬物処理による有意な延命効果がみられた（第28図）。D-Alaで

は延命効果がみられなかった（第 28 図）。

### 産業上の利用可能性

本発明のアミノ酸トランスポーター分子は、細胞の製造及び増殖に必要な栄養素である種々のアミノ酸の取り込みを媒介する重要な生物学的機能を有し、また、正常細胞での発現に比べ、幅広い種類の腫瘍細胞に発現が認められることから、該分子は、例えば抗腫瘍薬（抗癌剤）の開発におけるターゲットとして極めて有望である。

即ち、該分子の生物活性あるいは該分子の発現を抑制する活性を有する薬剤（アンチセンス DNA 医薬品、アンチセンス RNA 医薬品、抗体医薬品、抗体フラグメント医薬品、あるいはペプチドアンタゴニスト医薬品、低分子化合物等の非ペプチドアンタゴニスト医薬品など）を用いて、該分子を介した栄養素（種々のアミノ酸や生理活性物質）の腫瘍細胞内への取り込みを阻害することにより、腫瘍細胞を飢餓状態とし腫瘍細胞の生存及び増殖を阻害することが可能である。

従って、本発明のタンパク若しくはその一部、該タンパクをコードする DNA 若しくはその一部、該タンパクをコードする RNA 若しくはその一部、該 DNA にハイブリダイズする DNA、該 DNA を含む発現ベクター、該 DNA 若しくは該ベクターで形質転換された形質転換細胞、該 RNA が導入された細胞、該タンパク若しくはその一部に反応性を有する抗体若しくはその一部、該抗体を産生する細胞、該 DNA の一部を放射性標識してなる標識 DNA、該 RNA の一部を放射性標識してなる標識 RNA、該抗体または該抗体の一部を標識してなる標識抗体、該標識 DNA からなるキット、該標識 RNA からなるキット、並びに該標識抗体からなるキットは、そのような抗腫瘍効果を有する薬剤として、及び／またはそのような薬剤開発における試薬として提供されることができる。

また、本発明の DNA、RNA あるいは形質転換細胞等の種々の物質を用いることにより、本発明タンパクの生物活性を制御する（活性化、抑制、阻害）薬剤、本発明のタンパクの mRNA への転写を阻害する薬剤、該 mRNA から本発明のタンパクへの翻訳を阻害する薬剤、あるいは該タンパクの他の分子との相互作用を阻害する薬剤などの薬剤設計、スクリーニング（例えば、レポータージーンア

ッセイなど)、並びに同定が可能となる。

さらに、本発明のDNAの一部並びにRNAの一部は、コロニーハイブリダイゼーション法あるいはブラークハイブリダイゼーション法を用いてそれらとハイブリダイズするDNAあるいはRNAを同定する場合のプロープとして提供可能である。さらに、本発明のDNAの一部は、PCR法を用いて本発明のDNAあるいは本発明のトランスポーター分子をコードする遺伝子を増幅するためのプライマーとして提供可能である。

さらに、本発明のDNAの一部、該DNAに相補的なDNA、あるいは本発明のRNAの一部は、前述の試薬として提供されるのみならず、いわゆるアンチセンスDNA医薬あるいはアンチセンスRNA医薬として提供可能である。

本発明のタンパクは、該タンパク分子が細胞表面上に発現させた状態を利用することにより、前述したように、本発明のタンパクの生物活性または該タンパクの発現を制御する薬剤の同定を行うことができる。また、該タンパクのアミノ酸配列を基に、該タンパクの生物活性を阻害する能力を有するペプチドアンタゴニストを設計することができる。このように設計されたペプチドアンタゴニストは、本発明のタンパクであるアミノ酸トランスポーターの種々の基質との結合、あるいは本発明のタンパクの他の分子との結合を競合的に阻害することにより、本発明のタンパクの生物学的機能が発揮されないようにする医薬品として提供可能である。

本発明のタンパク及びその一部並びに該タンパクを発現する形質転換細胞等の細胞は、本発明のタンパクに対する抗体（抗血清、モノクローナル抗体）の作成における免疫感作抗原として提供可能である。

本発明のタンパクであるアミノ酸トランスポーター分子に反応性を有する抗血清（ポリクローナル抗体）並びにモノクローナル抗体は、該分子に結合することにより該分子の生物活性の発揮を阻害（中和）することによる抗体医薬品として提供可能である。

さらに、該抗体は、検出可能なシグナルをもららすことができる種々の物質で標識することにより、種々の生体試料（細胞、組織、臓器あるいは体液など）での本発明のタンパクの発現状態の分析（免疫組織染色、ウェスタンブロット、EL

ISAなど)における試薬として提供可能である。

このような標識抗体と同様に、本発明のDNAまたはその一部を検出可能なシグナルをもたらすことができる種々の物質で標識した標識DNAは、本発明のタンパクをコードする遺伝子の同定における試験(例えば、サザンブロッティング、FISHなど)における試薬として提供可能である。

また、同様に発明のRNAまたはその一部を、放射性同位体で標識した放射性標識RNAは、細胞、組織あるいは臓器における本発明のタンパクをコードするmRNAの発現状態の分析(ノーザンブロッティングなど)における試薬として提供可能である。

## 請 求 の 範 囲

1. アミノ酸の細胞内への輸送を媒介する能力を有する細胞表面タンパクであって、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)、フェニルアラニン (Phe)、メチオニン (Met)、チロシン (Tyr)、トリプトファン (Trp)、バリン (Val)及びヒスチジン (His)からなる群から選ばれる少なくとも1種類のアミノ酸の細胞内への取り込みをNa<sup>+</sup>非依存性で媒介する能力を有するタンパク。
2. タイプII膜糖タンパクに分類される4F2タンパク又はその一部と共存したとき、中性アミノ酸及びその類似物質を輸送する能力を有するタンパクである請求の範囲第1項に記載のタンパク。
3. タイプII膜糖タンパクに分類される4F2タンパクが、配列番号6若しくは8に記載のアミノ酸配列、又は、その一部のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するタンパクである請求の範囲第2項に記載のタンパク。
4. ヒト又はラット由来のタンパクである請求の範囲第1～3項のいずれかに記載のタンパク。
5. 下記(1)または(2)のいずれかのアミノ酸配列を有する請求の範囲第1～4項のいずれかに記載のタンパク。
  - (1) 配列番号2若しくは4に記載のアミノ酸配列；または
  - (2) 配列番号2若しくは4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列。
6. 配列番号2又は4に記載のアミノ酸配列中の部分アミノ酸配列を含み、抗原性を有するポリペプチド。
7. 請求の範囲第1～5項のいずれかに記載のタンパクをコードするDNA。
8. ヒト又はラット由来のDNAである請求の範囲第7項に記載のDNA。
9. 配列番号1に記載の塩基配列の塩基番号66乃至1586の塩基配列又は配列番号3に記載の塩基配列の塩基番号64乃至1599の塩基配列を有するDNAにストリンジントな条件下でハイブリダイズし、少なくとも1種類のアミノ酸の細胞内への取り込みを媒介する能力を有する細胞表面タンパクをコードする

DNA。

10. アミノ酸の細胞内への取り込みが、タイプII膜糖タンパクに分類される4F2タンパク又はその一部と共存下において媒介される細胞表面タンパクをコードする請求の範囲第9項に記載のDNA。

11. タイプII膜糖タンパクに分類される4F2タンパクが、配列番号6若しくは8に記載のアミノ酸配列、又は、その一部のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するタンパクである請求の範囲第10項に記載のDNA。

12. 請求の範囲第7～11項に記載のDNAから誘導され得るRNA。

13. RNAが配列番号26又は27に記載の塩基配列を有するRNAである請求の範囲第12項に記載のRNA。

14. 請求の範囲第7～11項のいずれかに記載のDNAを含む発現ベクター。

15. 請求の範囲第14項に記載の発現ベクターで形質転換された形質転換細胞。

16. 該形質転換細胞が、さらに配列番号5に記載の塩基配列の塩基番号110乃至1696の塩基配列及び該塩基番号1696の塩基に隣接するTAG、TGA若しくはTAAで表されるいずれか1つのナンセンス塩基配列からなる塩基配列を含むDNAで形質転換されていることを特徴とする請求の範囲第14又は15項に記載の形質転換細胞。

17. 該形質転換細胞が、さらにレポータータンパクをコードするDNAにより形質転換されていることを特徴とする請求の範囲第14～16項のいずれかに記載の形質転換細胞。

18. 請求の範囲第12又は13項に記載のRNAが導入されていることを特徴とするヒト由来の細胞。

19. 該細胞が、アフリカツメガエルの卵母細胞であることを特徴とする請求の範囲第18項に記載の細胞。

20. 請求の範囲第1～5項のいずれかに記載のタンパクまたは請求の範囲第6項に記載のポリペプチドに反応性を有する抗血清またはポリクローナル抗体。

21. 請求の範囲第1～5項のいずれかに記載のタンパクまたは請求の範囲第

6 項に記載のポリペプチドに反応性を有するモノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部。

2 2. 該モノクローナル抗体が、ヒト以外の哺乳動物由来のイムノグロブリンの可変領域、及びヒト由来のイムノグロブリンの定常領域とからなる組換キメラモノクローナル抗体であることを特徴とする請求の範囲第 2 1 項に記載のモノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部。

2 3. 該モノクローナル抗体が、ヒト以外の哺乳動物由来のイムノグロブリンの超可変領域の相補性決定領域の一部または全部、ヒト由来のイムノグロブリンの超可変領域の枠組領域、及びヒト由来のイムノグロブリンの定常領域とからなる組換ヒト型モノクローナル抗体であることを特徴とする請求の範囲第 2 1 項に記載のモノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部。

2 4. 該モノクローナル抗体が、ヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする請求の範囲第 2 1 ～ 2 3 項のいずれかに記載のモノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部。

2 5. 請求の範囲第 2 1 ～ 2 4 項のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生する細胞。

2 6. 該細胞が、該モノクローナル抗体を産生する能力を有する非ヒト哺乳動物由来の B 細胞と哺乳動物由来のミエローマ細胞とを融合して得られる融合細胞であることを特徴とする請求の範囲第 2 5 項に記載の細胞。

2 7. 該細胞が、該モノクローナル抗体の重鎖をコードする DNA 若しくはその軽鎖をコードする DNA のいずれか一方の DNA、または両方の DNA が細胞内に導入されることにより形質転換された遺伝子組換え細胞であることを特徴とする請求の範囲第 2 5 項に記載の細胞。

2 8. 請求の範囲第 7 ～ 1 1 項のいずれかに記載の DNA 及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

2 9. 該医薬組成物が、腫瘍細胞の増殖を抑制するために用いられることを特徴とする請求の範囲第 2 8 項に記載の医薬組成物。

3 0. 請求の範囲第 1 2 又は 1 3 項に記載の RNA 及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。



31. 該医薬組成物が、腫瘍細胞の増殖を抑制するために用いられることを特徴とする請求の範囲第30項に記載の医薬組成物。

32. 請求の範囲第20項に記載の抗血清若しくはポリクローナル抗体、及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

33. 該医薬組成物が、腫瘍細胞の増殖を抑制するために用いられることを特徴とする請求の範囲第32項に記載の医薬組成物。

34. 請求の範囲第21～24項のいずれかに記載のモノクローナル抗体もしくは該モノクローナル抗体の一部、及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

35. 該医薬組成物が、腫瘍細胞の増殖を抑制するために用いられることを特徴とする請求の範囲第34項に記載の医薬組成物。

36. 請求の範囲第21～24項のいずれかに記載のモノクローナル抗体を、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識してなる標識モノクローナル抗体。

37. 標識物質が、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジン、または放射性同位体であることを特徴とする請求の範囲第36項に記載の標識モノクローナル抗体。

38. 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパクまたはその断片を検出するためのキットであって、請求の範囲36または請求の範囲第37項に記載の標識モノクローナル抗体からなることを特徴とするキット。

39. 試料中のタンパクの発現の有無または発現量を調べる方法であって、

(1) 試料に請求の範囲第36または37項に記載の標識モノクローナル抗体を接触させる工程；及び

(2) 該試料に結合した該標識モノクローナル抗体の量を、該標識モノクローナル抗体に結合している標識物質の種類に応じて、蛍光、化学発光若しくは放射性を検出することにより測定する工程、を含むことを特徴とする方法。

40. 試料が、腫瘍細胞、腫瘍組織または腫瘍を有する臓器若しくはその一部であることを特徴とする請求の範囲第39項に記載の方法。

41. 請求の範囲第7～11項のいずれかに記載のDNA又はその断片を、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジンまたは放射性同位体で標識してなる標識DNA。
42. 請求の範囲第12または13項に記載のRNA又はその断片を放射性同位体で標識してなる放射性標識RNA。
43. 請求の範囲第1～5項のいずれかに記載のタンパクをコードする遺伝子を検出するためのキットであって、請求の範囲第41項に記載の標識DNAまたは請求の範囲第42項に記載の放射性RNAからなることを特徴とするキット。
44. 請求の範囲第1～5項のいずれかに記載のタンパクを用いて、当該タンパクの有する中性アミノ酸類を輸送する能力に対する被検物質の基質としての作用を検出する方法。
45. 請求の範囲第7～11項のいずれかに記載のDNAで形質転換された細胞を用いる請求の範囲第44項に記載の方法。
46. アフリカツメガエルの卵母細胞を用いる請求の範囲第44項に記載の方法。
47. 被検物質が、アミノ酸以外の物質である請求の範囲第44～46項のいずれかに記載の方法。
48. 請求の範囲第1～5項のいずれかの項に記載のタンパクを用いて、当該タンパクの有する中性アミノ酸及びその類似物質を輸送する能力を阻害する作用を有する被検物質をスクリーニングする方法。
49. 請求の範囲第7～11項のいずれかに記載のDNAで形質転換された細胞を用いる請求の範囲第48項に記載の方法。
50. アフリカツメガエルの卵母細胞を用いる請求の範囲第48項に記載の方法。
51. 請求の範囲第7～11項のいずれかに記載のDNAのmRNAへの転写又は請求の範囲第1～5項のいずれかに記載のタンパクの発現を阻害する能力を有する物質を同定する方法。
52. 請求の範囲第44～51項のいずれかに記載の方法により検出、スクリーニング又は同定された物質。

53. 当該物質が、腫瘍細胞の増殖を阻害する能力を有する物質であることを特徴とする請求の範囲第52項に記載の物質。

54. 外来性遺伝子を有するトランスジェニックマウスであって、該マウスは、その内在性遺伝子上に配列番号2又は4に記載のアミノ酸配列を有するタンパクをコードするDNAが組み込まれることにより、該タンパクを発現する細胞を体内に有することを特徴とするトランスジェニックマウス。

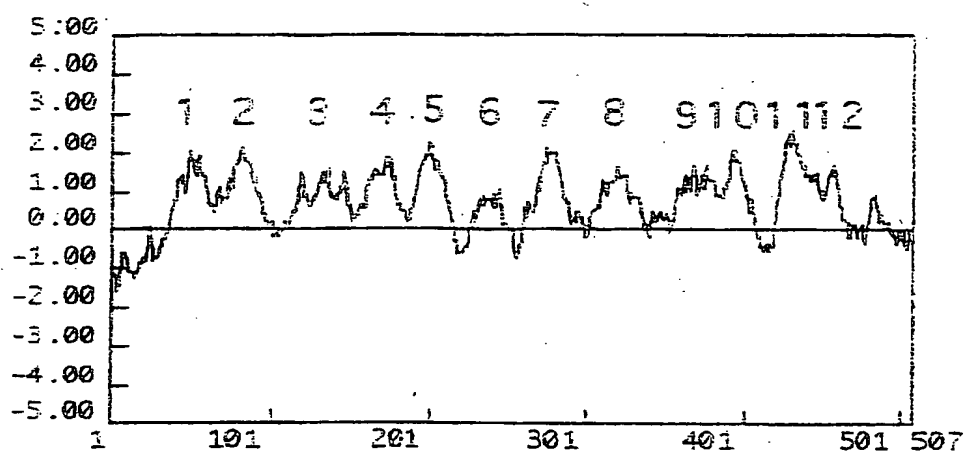
55. 当該DNAが、配列番号1に記載の塩基配列の塩基番号66乃至1586の塩基配列及び該塩基番号1586の塩基に隣接するTAG、TGA若しくはTAAで表されるいずれか1つのナンセンス塩基配列からなる塩基配列、又は配列番号3に記載の塩基配列の塩基番号64乃至1599の塩基配列及び該塩基番号1599の塩基に隣接するTAG、TGA若しくはTAAで表されるいずれか1つのナンセンス塩基配列からなる塩基配列を含むDNAであることを特徴とする請求の範囲第54項に記載のトランスジェニックマウス。



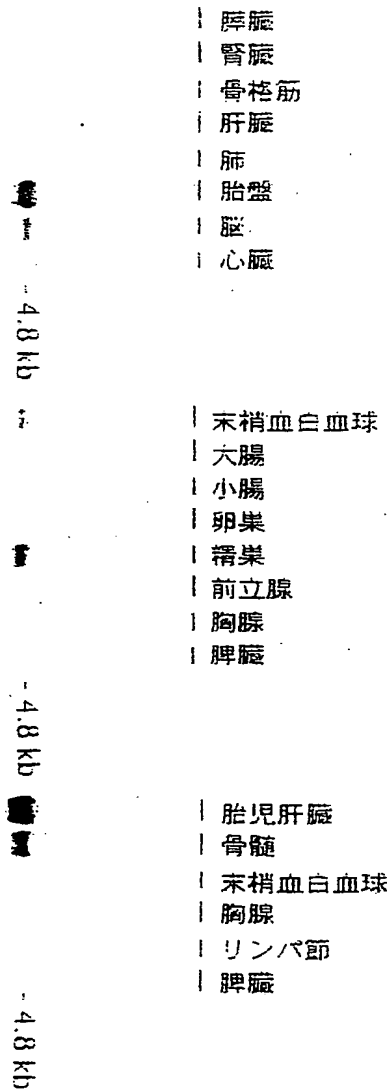
第 1 页

1	MAGAGPKRRALAAPA--AEEKEE--AREKMLAAKSADGSA-PAGEGEVGT	50
1	MAVAGAKRRAVAAPATTAEE-EERQAREKMLEARRGDG-ADP--EGEGVT	50
51	LQRNITLLNGVAIIIVGTIIGSGIFVTPTGVLKEAGSPGLALVYWAACGVF	100
51	LQRNITLINGVAIIIVGTIIGSGIFVTPTGVLKEAGSPGLSLVWAVCGVF	100
101	SIVGALCYAELGTTISKSGGDYAYMLEVYGS LPAFLKLWIELLIIRPSSQ	150
101	SIVGALCYAELGTTISKSGGDYAYMLEVYGS LPAFLKLWIELLIIRPSSQ	150
151	YIVALVFATYLLKPLFPTCPVPEEAAKLVACL CVLLLTAVNCYSVKAATR	200
151	YIVALVFATYLLKPVFPTCPVPEEAAKLVACL CVLLLTAVNCYSVKAATR	200
201	VQDAFAAAKLLALALIILLGFVQIGK--G--DVS NLDPNFSFEGTKLDVG	250
201	VQDAFAAAKLLALALIILLGFIQMGKDIGQGDASNLHQKLSFEGTNLDVG	250
251	NIVLALYSGLFAYGGWNYLNFVTEEMINPYRNLPLAIIISLPIVTLVYVL	300
251	NIVLALYSGLFAYGGWNYLNFVTEEMINPYRNLPLAIIISLPIVTLVYVL	300
301	TNLAYFTTLSTEQMLSSEAVAVDFGNYHLGVMSWIIIPVFVGLSCFGSVNG	350
301	TNLAYFTTLSTNQMLTSEAVAVDFGNYHLGVMSWIIIPVFVGLSCFGSVNG	350
351	SLFTSSRLFFVGSREGHLPSILSMIHPQLLTPVPSLVFTCVMTLLYAFSK	400
351	SLFTSSRLFFVGSREGHLPSILSMIHPQLLTPVPSLVFTCVMTLMYAFSR	400
401	DIFSVINFFSFFNWLCVALAIIIGMIWLRHRKPELERPIKVN LALPVFFIL	450
401	DIFSIINFFSFFNWLCVALAIIIGMMWLRFKKPELERPIKVN LALPVFFIL	450
451	ACLFLIAVSFWKTPVECGIGFTIILSGLPVYFFGVWWKNKPKWLLQGIFS	500
451	ACLFLIAVSFWKTPLECGIGFAIILSGLPVYFFGVWWKNKPKWILQVIFS	500
501	TTVLCQKLMQVVPQET.....	550
501	VTVLCQKLMQVVPQET.....	550

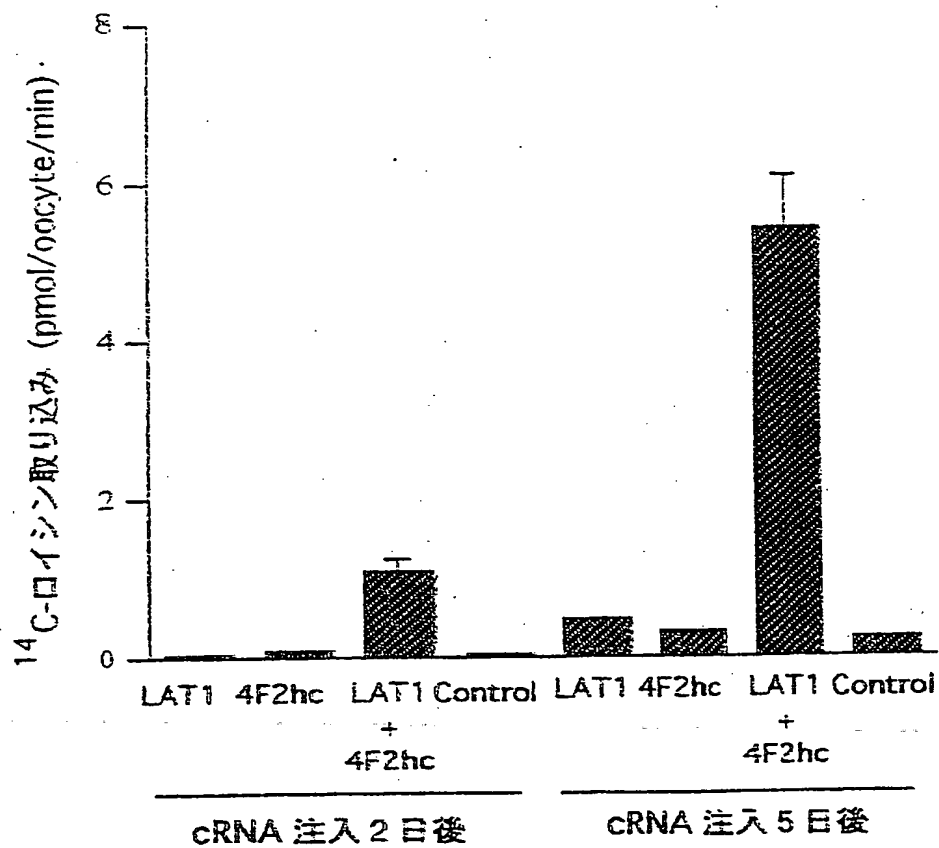
## 第 2 図



第 3 図

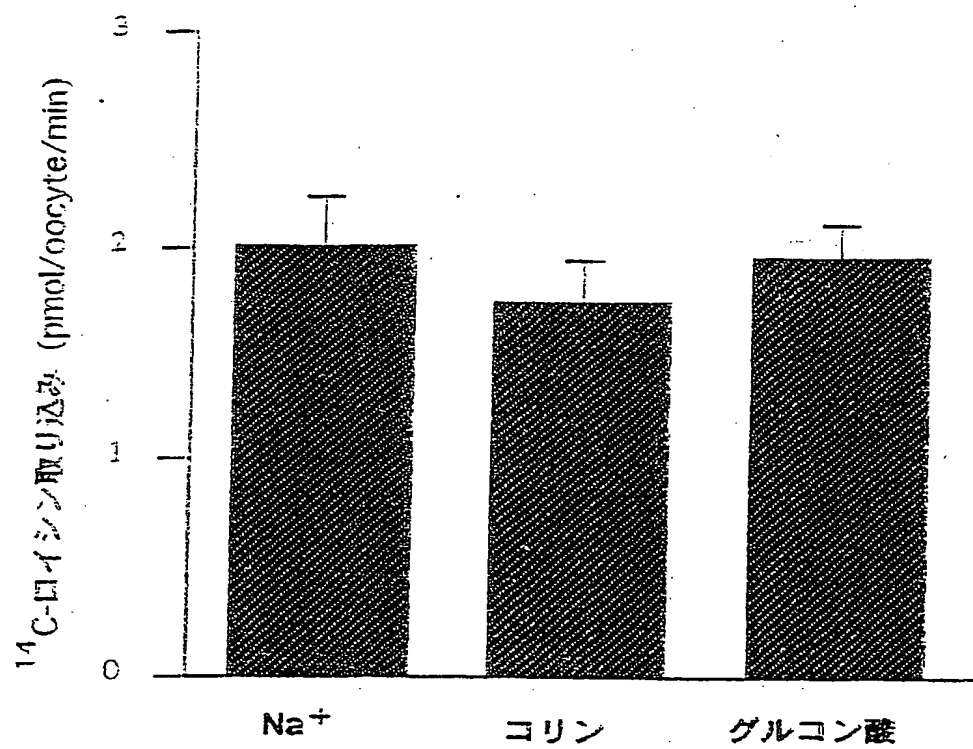


## 第 4 図

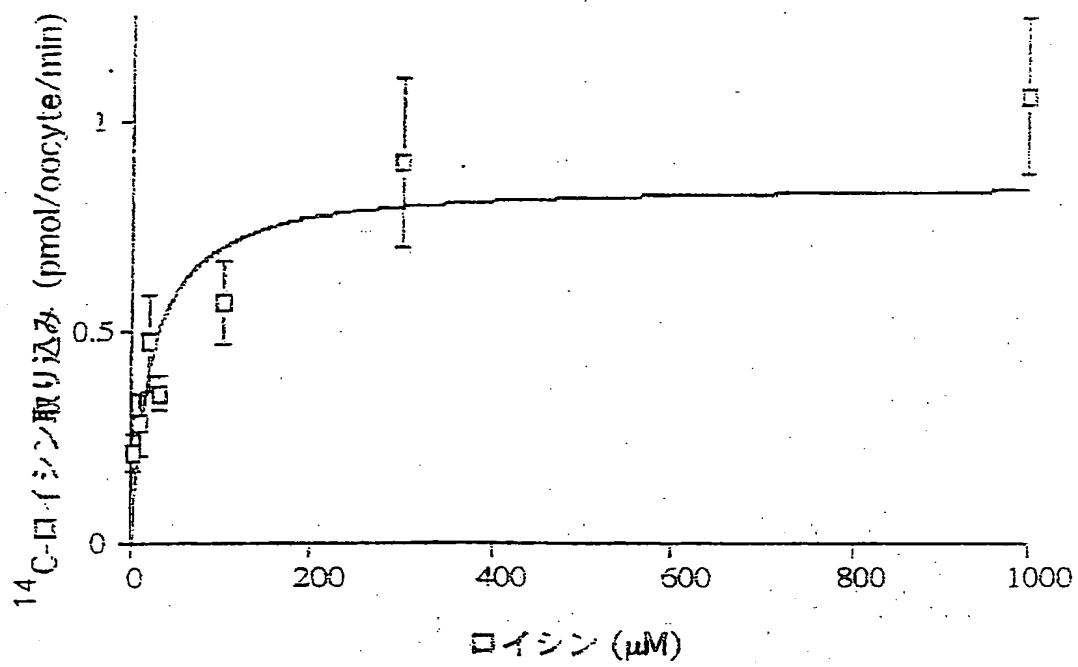




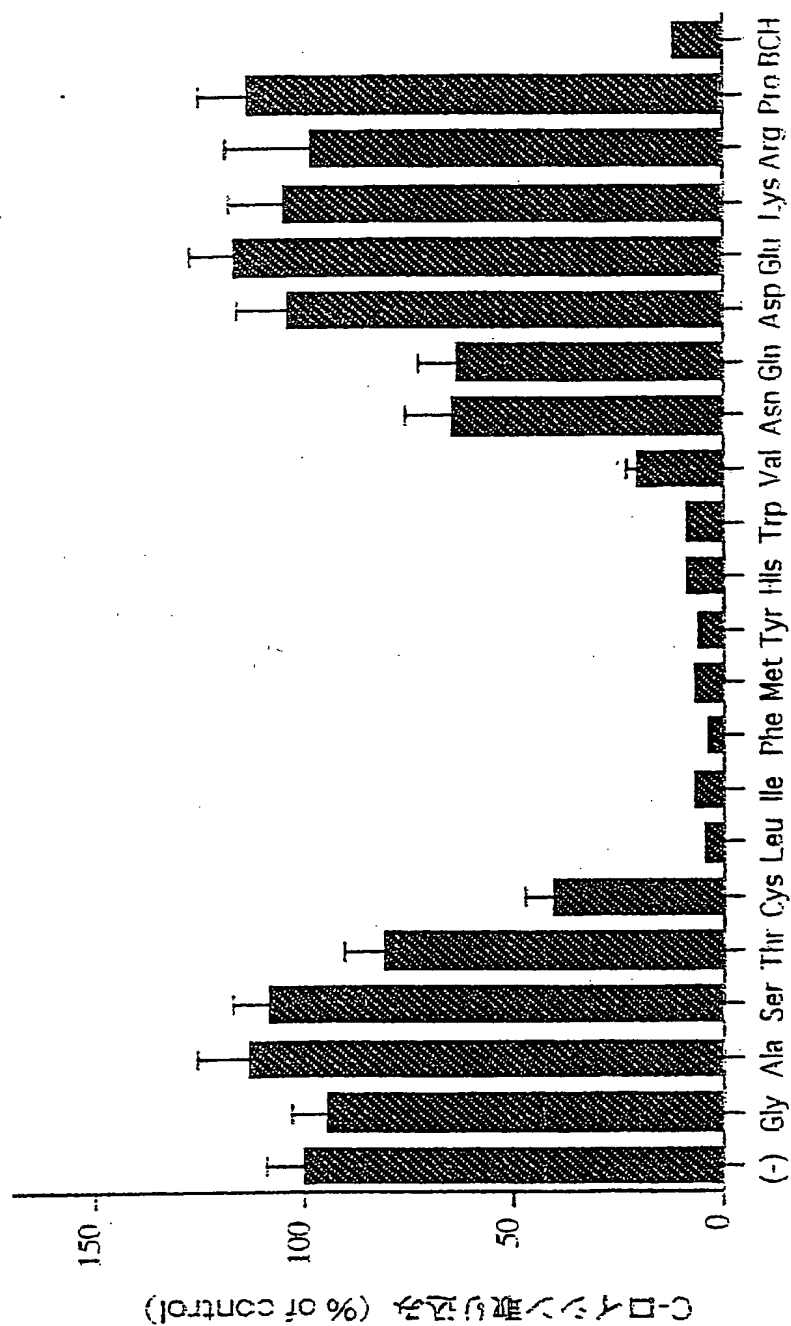
## 第 5 図



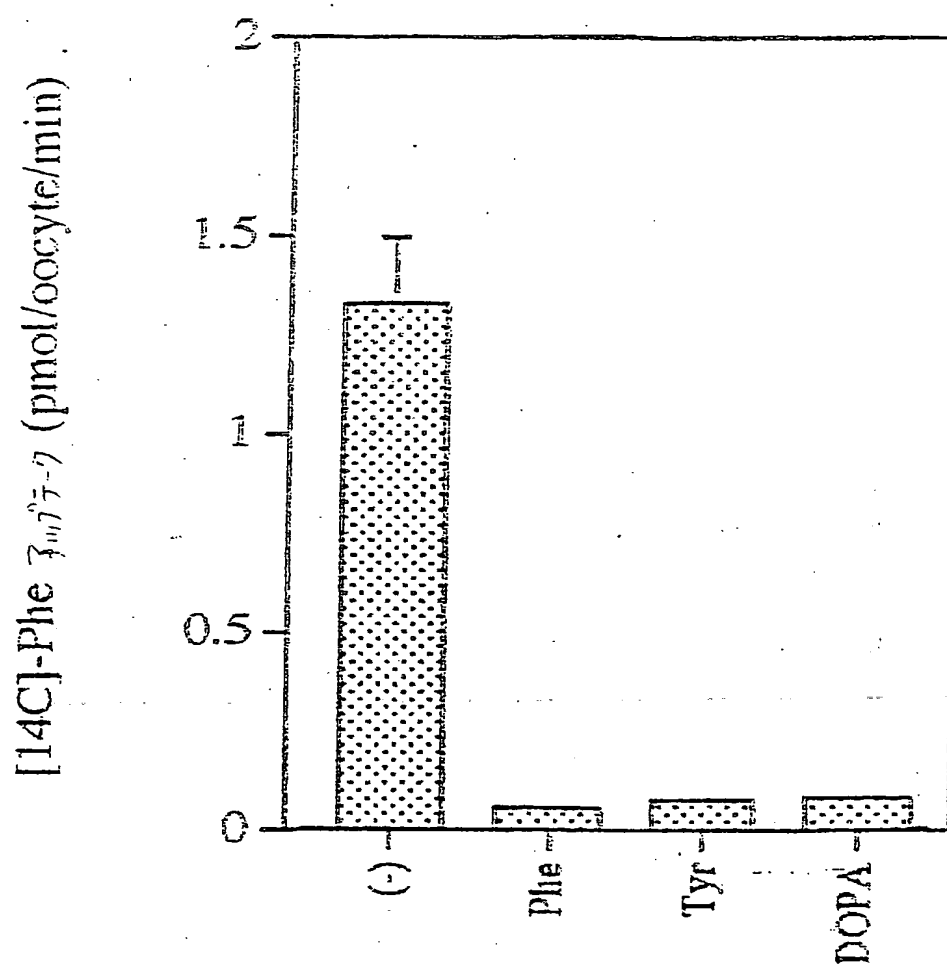
## 第 6 図



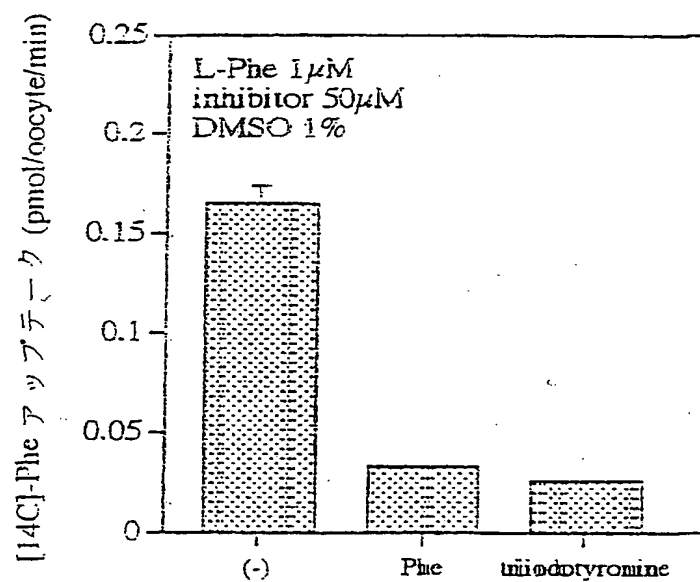
第 7 図



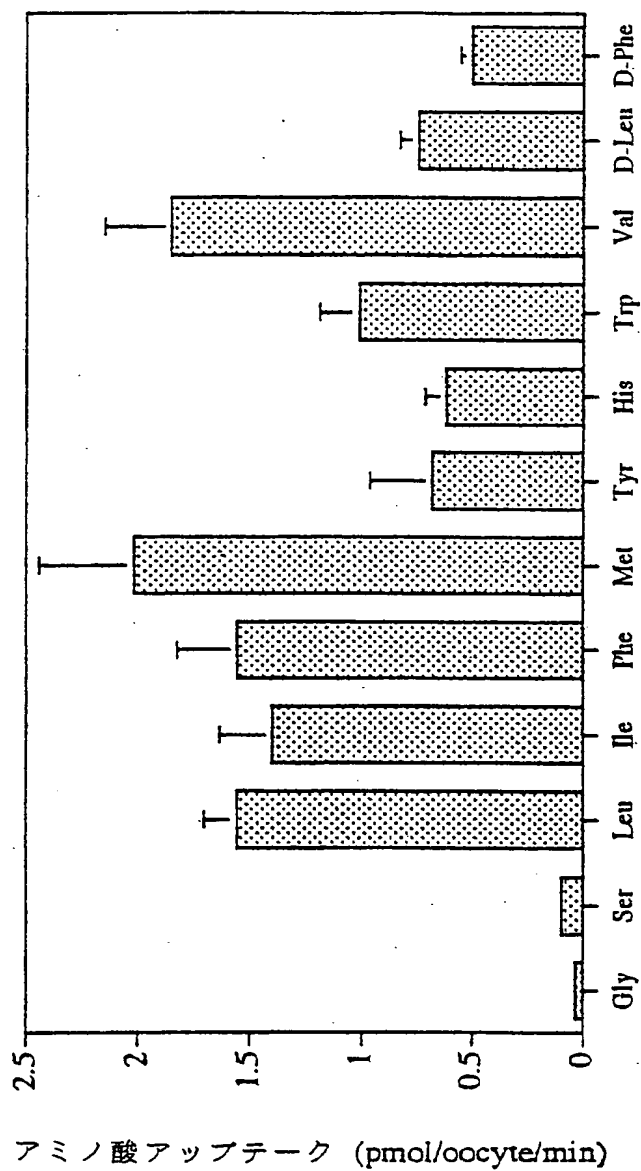
## 第 8 図



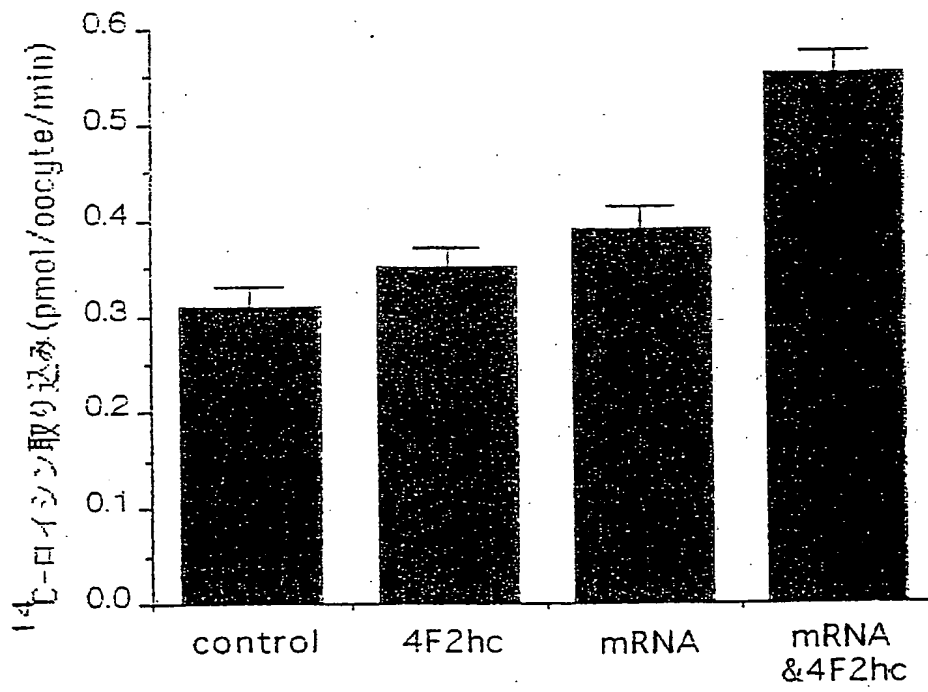
## 第 9 図



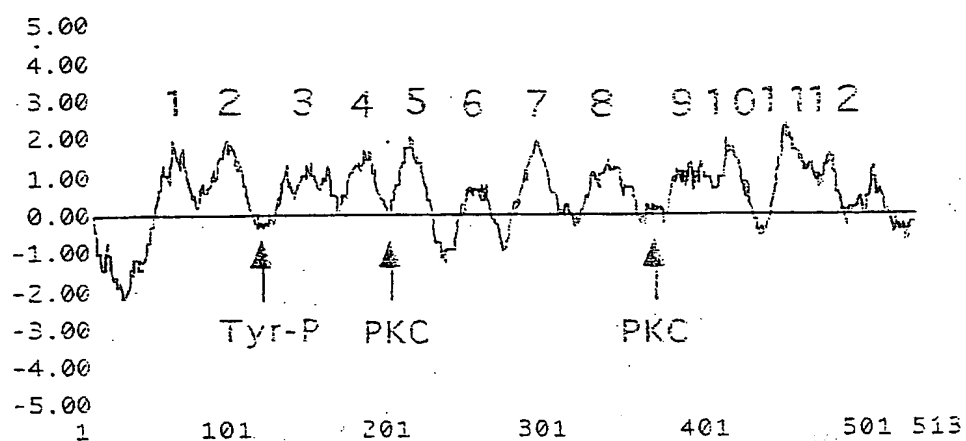
第 10 図



## 第 11 図

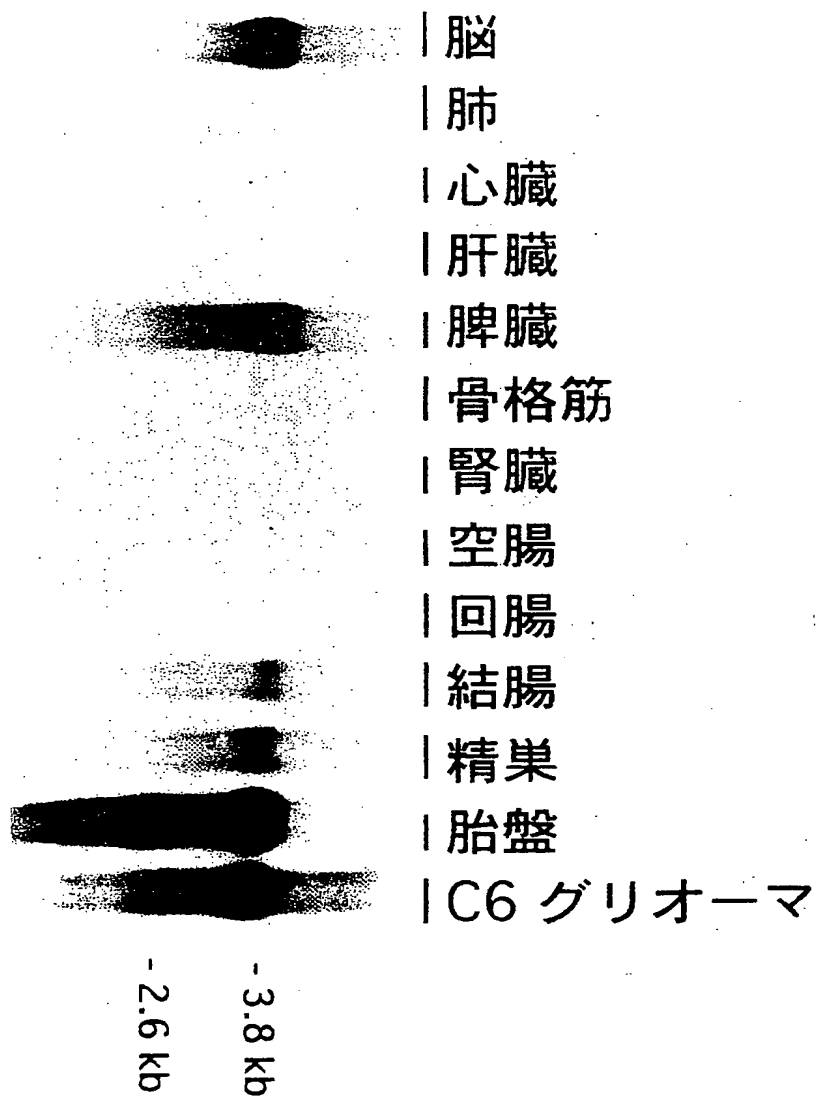


第 1.2 図

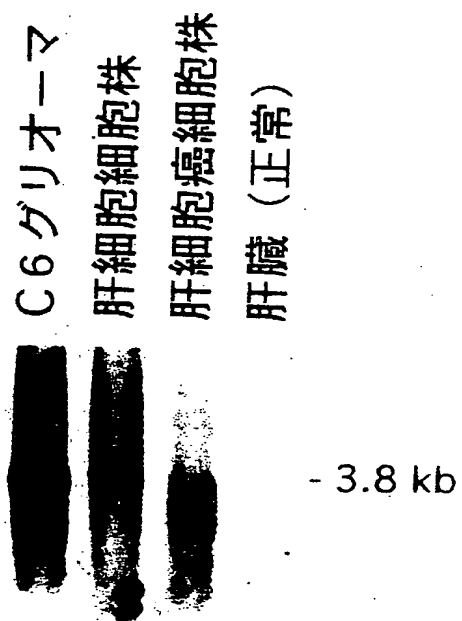


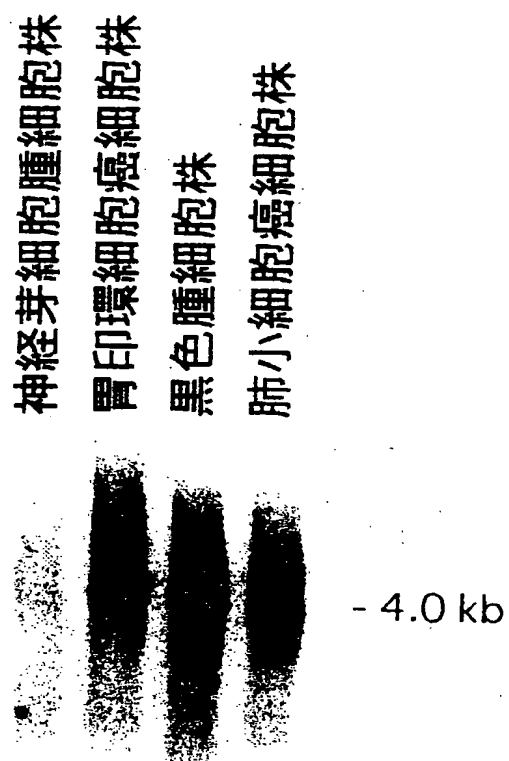


第 1 3 図

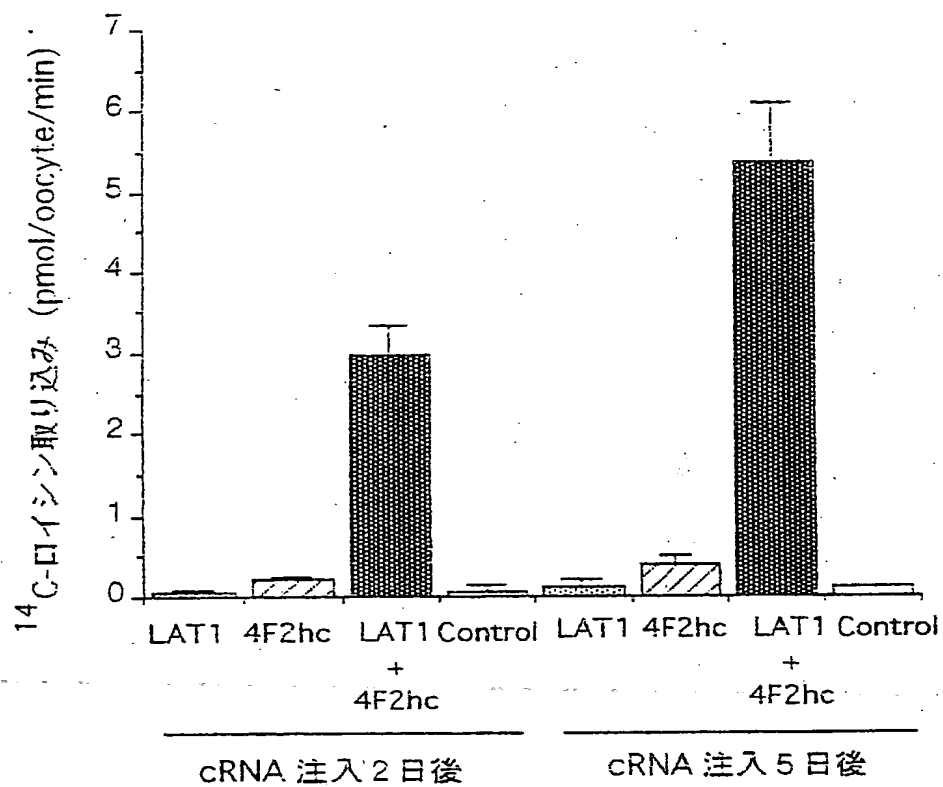


第 1 4 図

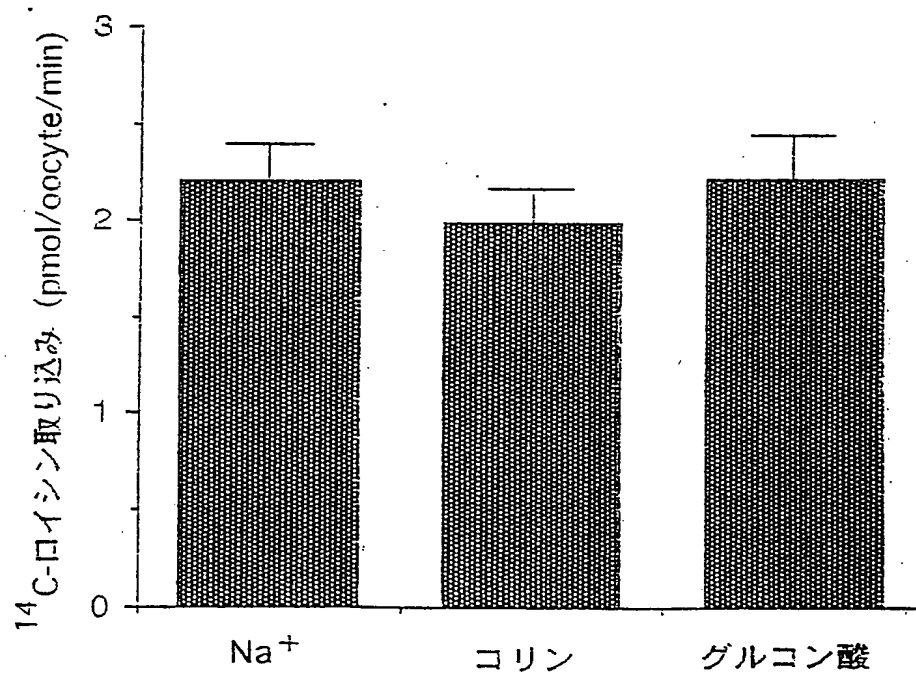




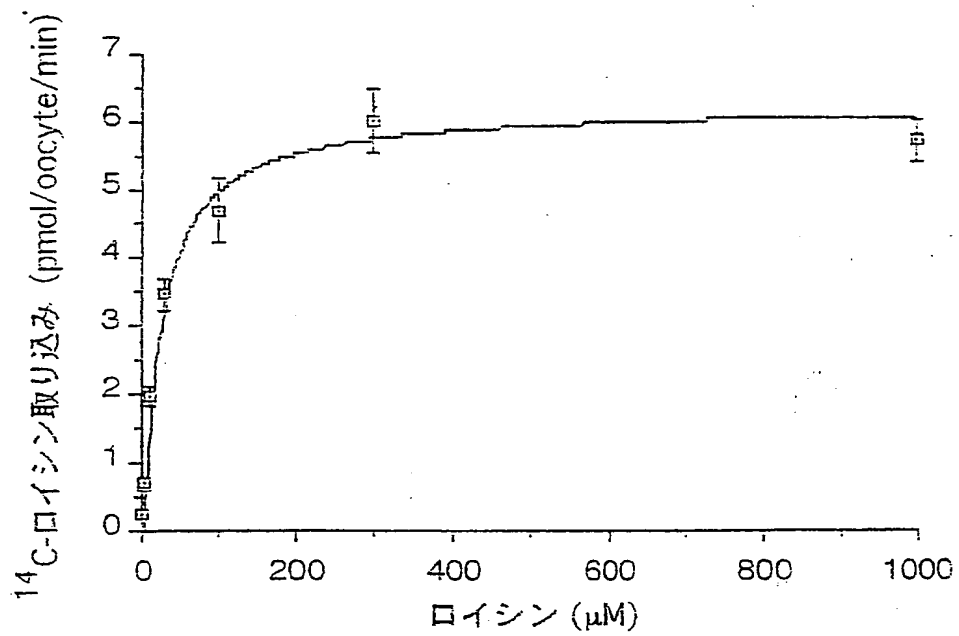
## 第 16 図



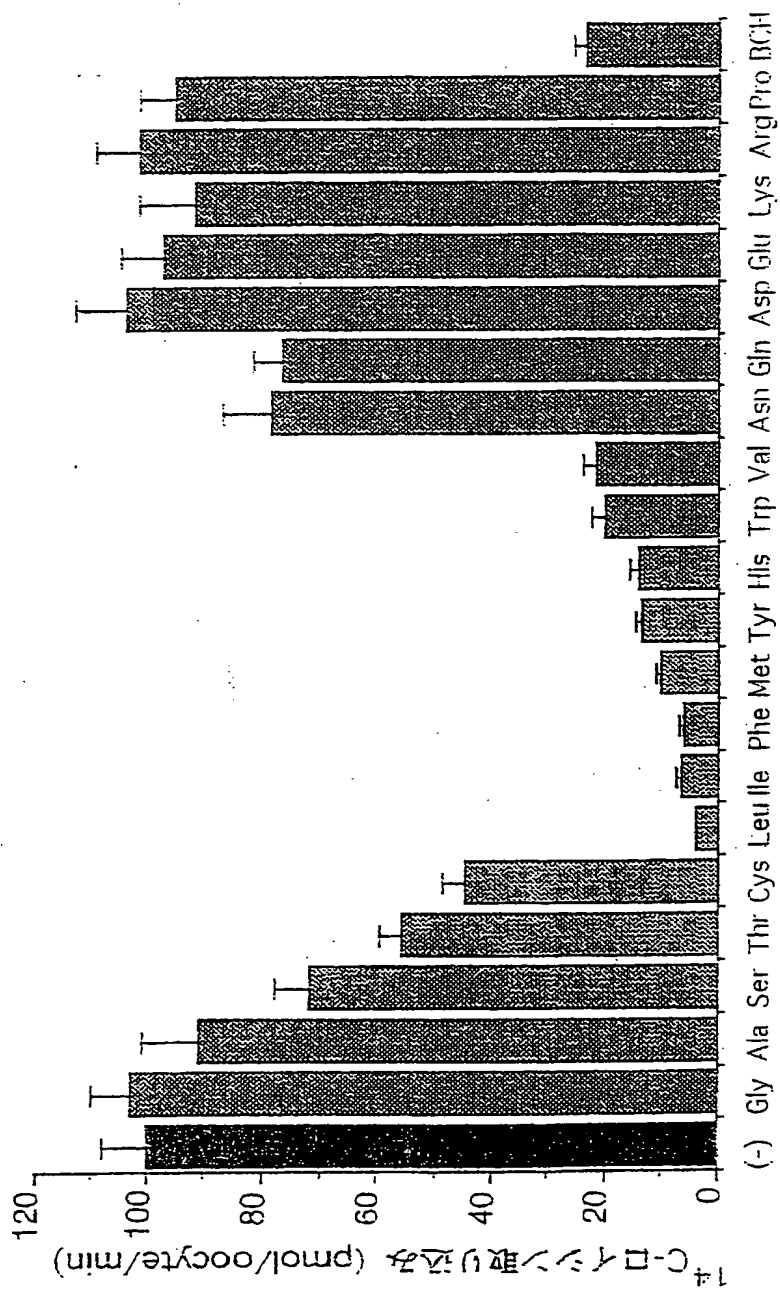
第 17 図



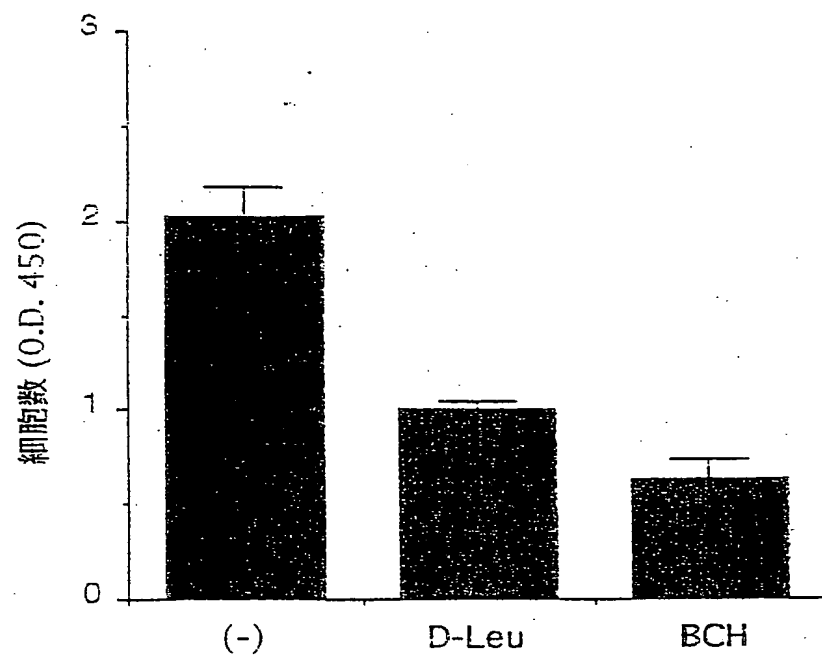
## 第 18 図



第 19 図

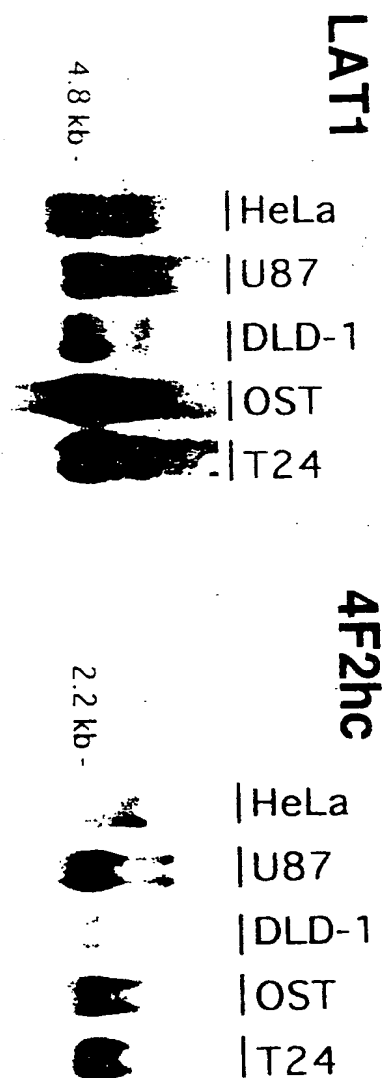


## 第 20 図

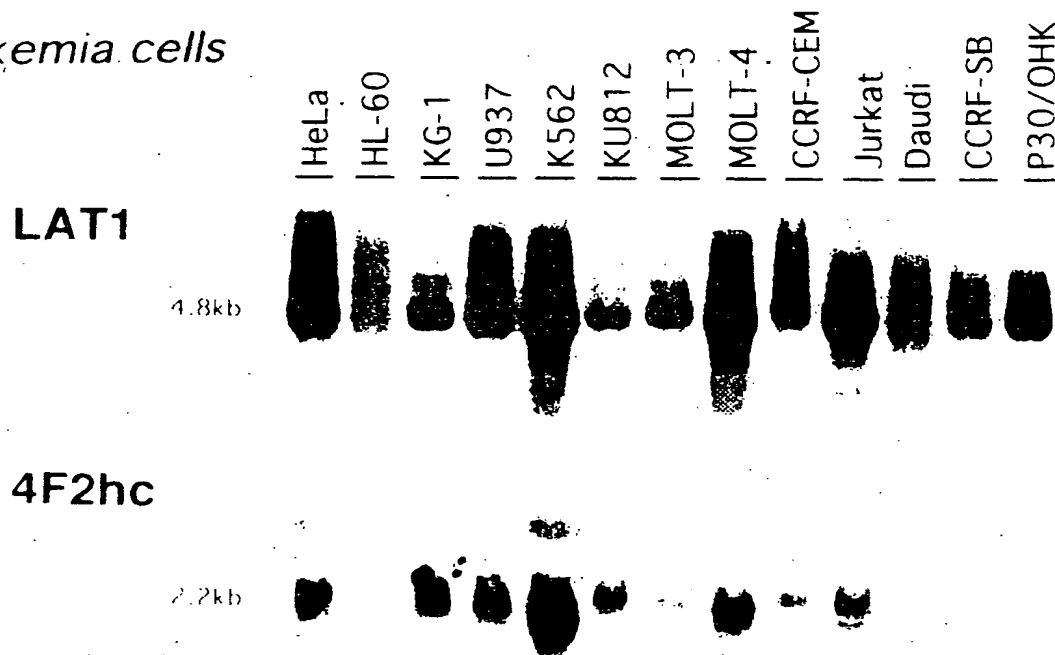




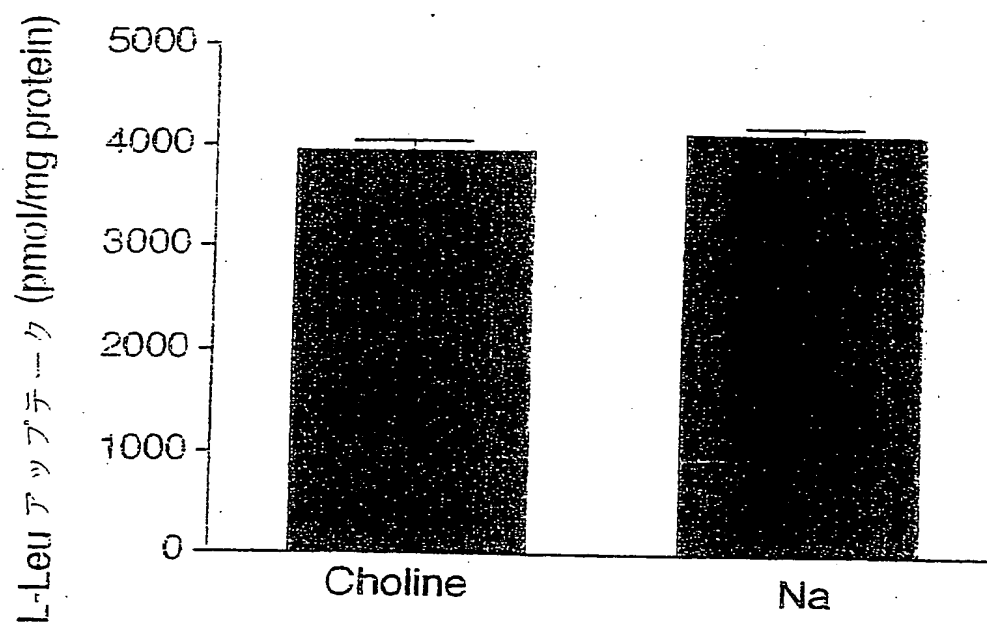
第 21 図



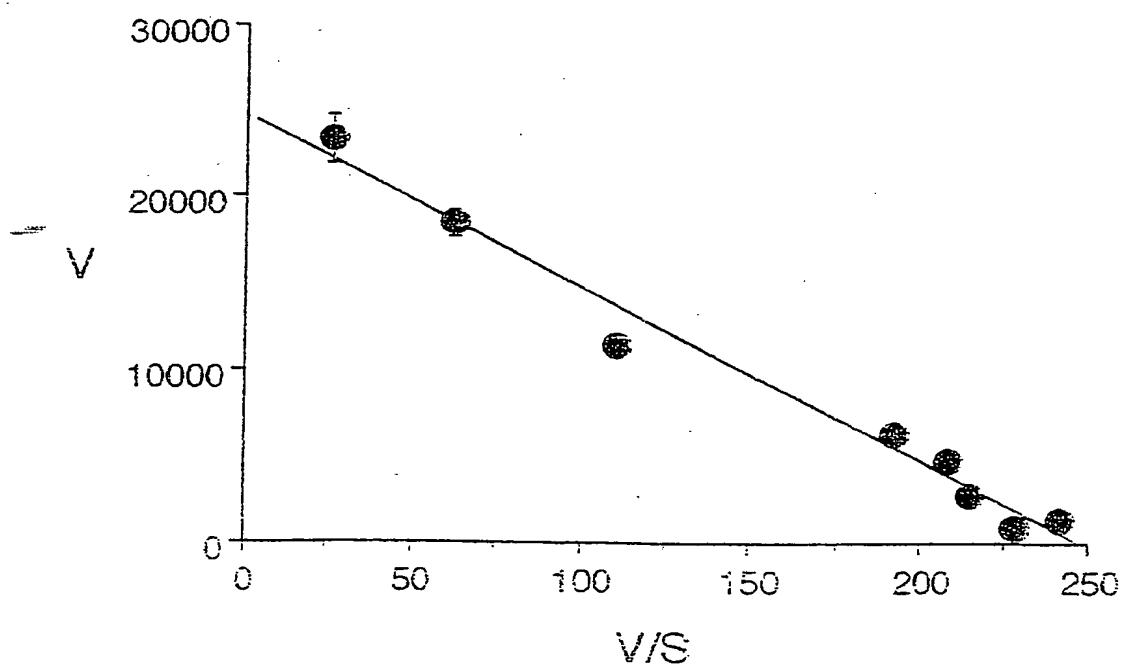
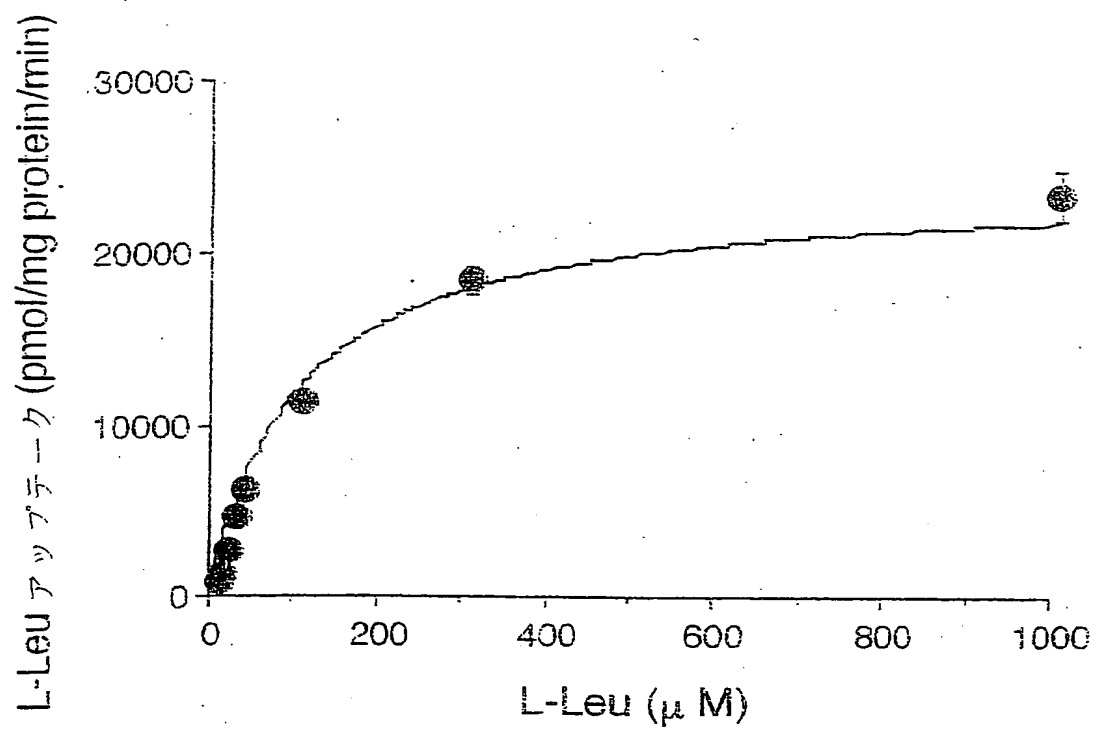
*Leukemia cells*



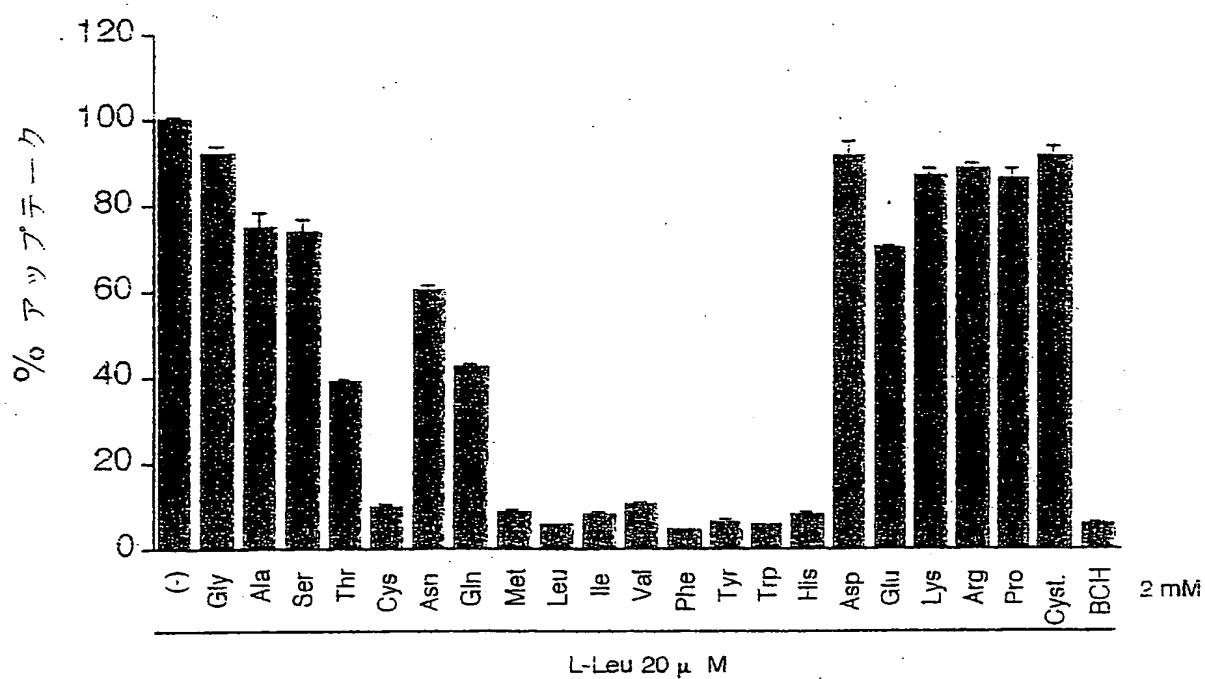
第 23 図



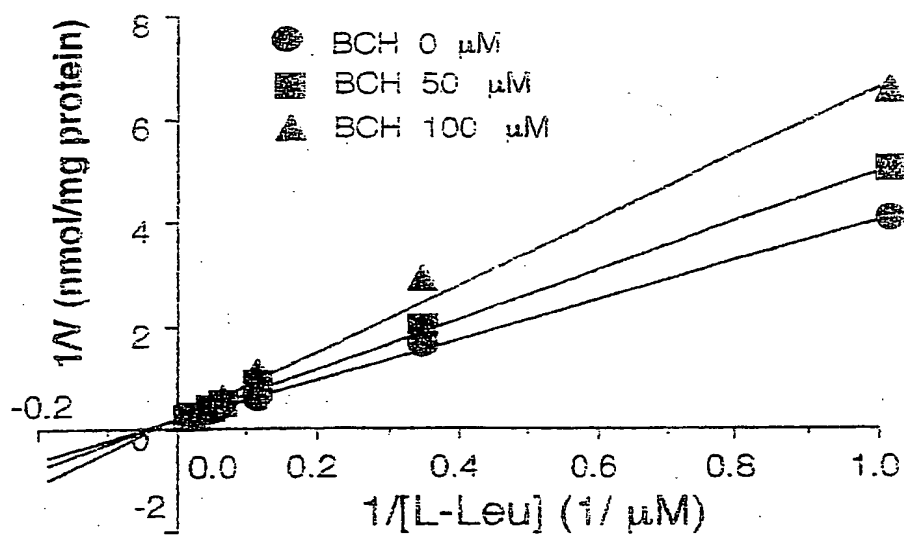
## 第 2 4 図



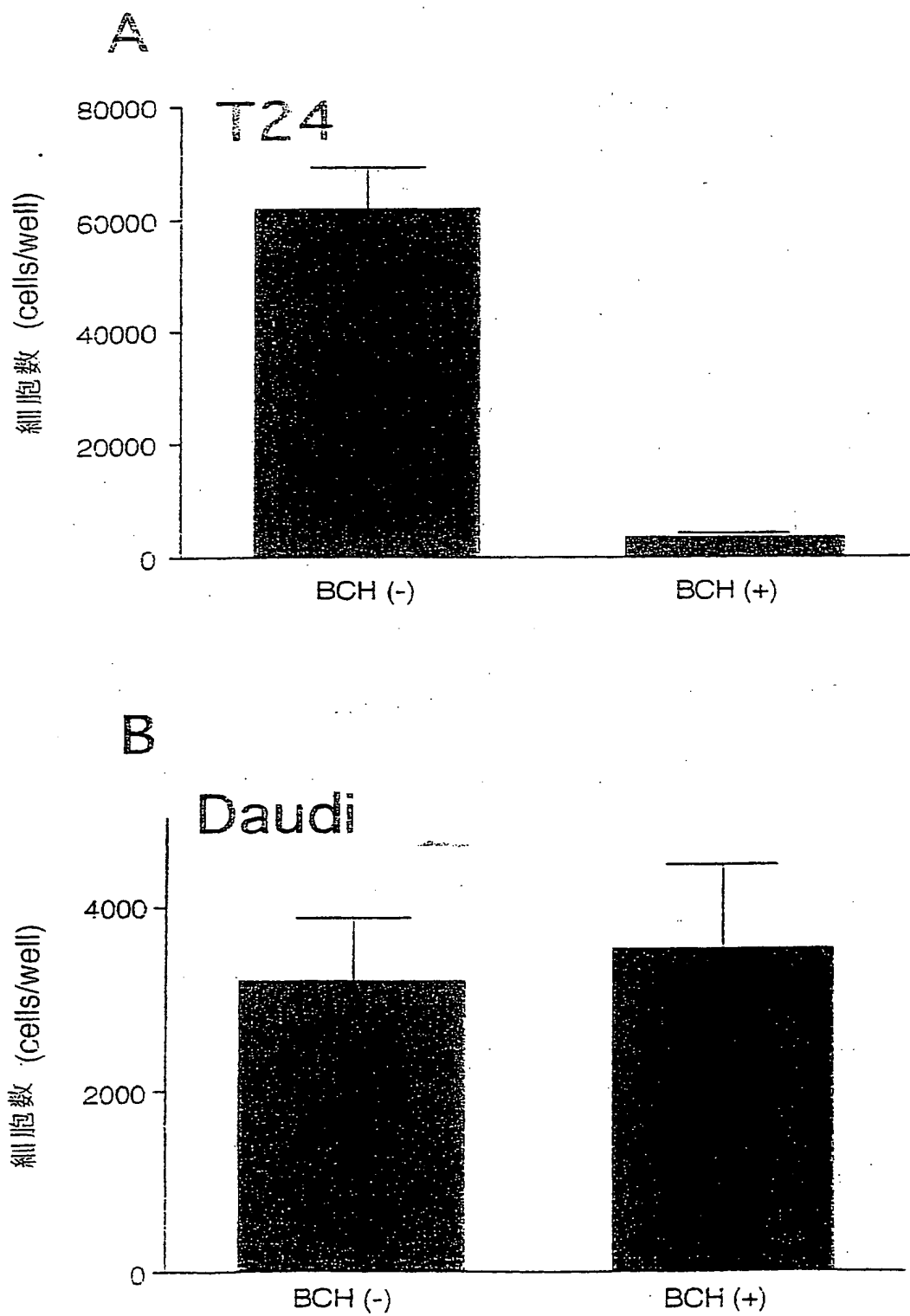
## 第 25 図



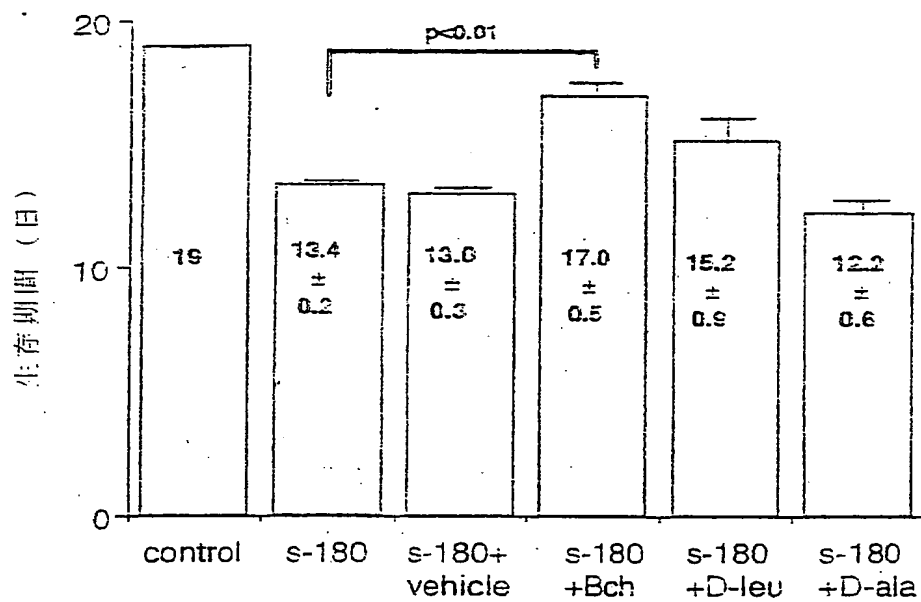
## 第 26 図



## 第 27 図



第 28 図



Bch  
D-leu : 300 mg/kg/day x 10 days  
D-ala



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Amino Acid Transporter And Gene Thereof

<130> PC901338

<140>

<141>

<160> 27

<210> 1

<211> 4539

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> 5' UTR

<222> (1).. (65)

<220>

<221> CDS

<222> (66).. (1589)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 3' UTR

&lt;222&gt; (1590).. (4474)

&lt;400&gt; 1

cggcgcgcac actgctcgct gggccgcggc tcccgggtgt cccaggcccg gccggtgcgc 60

agagc atg gcg ggt gcg ggc ccg aag cgg cgc gcg cta gcg gcg ccg gcg 110

Met Ala Gly Ala Gly Pro Lys Arg Arg Ala Leu Ala Ala Pro Ala

1

5

10

15

gcc gag gag aag gaa gag gcg cgg gag aag atg ctg gcc gcc aag agc 158

Ala Glu Glu Lys Glu Glu Ala Arg Glu Lys Met Leu Ala Ala Lys Ser

20

25

30

gcg gac ggc tcg gcg ccg gca ggc gag ggc gag ggc gtg acc ctg cag 206

Ala Asp Gly Ser Ala Pro Ala Gly Glu Gly Glu Gly Val Thr Leu Gln

35

40

45

cgg aac atc acg ctg ctc aac ggc gtg gcc atc atc gtg ggg acc att 254

Arg Asn Ile Thr Leu Leu Asn Gly Val Ala Ile Ile Val Gly Thr Ile

50

55

60

atc ggc tcg ggc atc ttc gtg acg ccc acg ggc gtg ctc aag gag gca 302

Ile Gly Ser Gly Ile Phe Val Thr Pro Thr Gly Val Leu Lys Glu Ala

65

70

75

ggc tcg ccg ggg ctg gcg ctg gtg gtg tgg gcc gcg tgc ggc gtc ttc 350

Gly Ser Pro Gly Leu Ala Leu Val Val Trp Ala Ala Cys Gly Val Phe

85

90

95

ggc gcg ctc tgc tac gcg gag ctc ggc acc acc atc tcc 398

Gly Ala Leu Cys Tyr Ala Glu Leu Gly Thr Thr Ile Ser

100

105

110

ggc gac tac gcc tac atg ctg gag gtc tac ggc tgc ctg 446

Gly Asp Tyr Ala Tyr Met Leu Glu Val Tyr Gly Ser Leu

115

120

125

ctc aag ctc tgg atc gag ctg ctc atc atc cgg cct tca 494

Leu Lys Leu Trp Ile Glu Leu Leu Ile Ile Arg Pro Ser

135

140

atc gtg gcc ctg gtc ttc gcc acc tac ctg ctc aag ccg 542

Ile Val Ala Leu Val Phe Ala Thr Tyr Leu Leu Lys Pro

150

155

acc tgc ccg gtg ccc gag gag gca gcc aag ctc gtg gcc 590

Thr Cys Pro Val Pro Glu Glu Ala Ala Lys Leu Val Ala

165

170

175

gtg ctg ctg ctc acg gcc gtg aac tgc tac agc gtg aag 638

Val Leu Leu Leu Thr Ala Val Asn Cys Tyr Ser Val Lys

180

185

190

cgg gtc cag gat gcc ttt gcc gcc gcc aag ctc ctg gcc 686

Arg Val Gln Asp Ala Phe Ala Ala Ala Lys Leu Leu Ala

195

200

205

ctg gcc ctg atc atc ctg ctg ggc ttc gtc cag atc ggg aag ggt gat 734

Leu Ala Leu Ile Ile Leu Leu Gly Phe Val Gln Ile Gly Lys Gly Asp

210

215

220

gig tcc aat cta gat ccc aac ttc tca ttt gaa ggc acc aaa ctg gat 782

Val Ser Asn Leu Asp Pro Asn Phe Ser Phe Glu Gly Thr Lys Leu Asp

225

230

235

gtg ggg aac att gig ctg gca tta tac agc ggc ctc ttt gcc tat gga 830

Val Gly Asn Ile Val Leu Ala Leu Tyr Ser Gly Leu Phe Ala Tyr Gly

240

245

250

255

gga tgg aat tac ttg aat ttc gtc aca gag gaa atg atc aac ccc tac 878

Gly Trp Asn Tyr Leu Asn Phe Val Thr Glu Glu Met Ile Asn Pro Tyr

260

265

270

aga aac ctg ccc ctg gcc atc atc atc tcc ctg ccc atc gtg acg ctg 926

Arg Asn Leu Pro Leu Ala Ile Ile Ile Ser Leu Pro Ile Val Thr Leu

275

280

285

gig tac gtg ctg acc aac ctg gcc tac ttc acc acc ctg tcc acc gag 974

Val Tyr Val Leu Thr Asn Leu Ala Tyr Phe Thr Thr Leu Ser Thr Glu

290

295

300

cag atg ctg tcg tcc gag gcc gig gcc gtg gac ttc ggg aac tat cac 1022

Gln Met Leu Ser Ser Glu Ala Val Ala Val Asp Phe Gly Asn Tyr His

305

310

315

ctg ggc glc atg tcc tgg atc atc ccc gtc ttc gtg ggc ctg tcc tgc 1070  
 Leu Gly Val Met Ser Trp Ile Ile Pro Val Phe Val Gly Leu Ser Cys  
 320 325 330 335

ttc ggc tcc glc aat ggg tcc ctg ttc aca tcc tcc agg ctc ttc ttc 1118  
 Phe Gly Ser Val Asn Gly Ser Leu Phe Thr Ser Ser Arg Leu Phe Phe  
 340 345 350

gtg ggg tcc cgg gaa ggc cac ctg ccc tcc atc ctc tcc atg atc cac 1166  
 Val Gly Ser Arg Glu Gly His Leu Pro Ser Ile Leu Ser Met Ile His  
 355 360 365

cca cag ctc ctc acc ccc gtg ccg tcc ctc gtg ttc acg tgt gtg atg 1214  
 Pro Gln Leu Leu Thr Pro Val Pro Ser Leu Val Phe Thr Cys Val Met  
 370 375 380

acg ctg ctc tac gcc ttc tcc aag gac atc ttc tcc gtc atc aac ttc 1262  
 Thr Leu Leu Tyr Ala Phe Ser Lys Asp Ile Phe Ser Val Ile Asn Phe  
 385 390 395

ttc agc ttc ttc aac tgg ctc tgc gtg gcc ctg gcc atc atc ggc atg 1310  
 Phe Ser Phe Phe Asn Trp Leu Cys Val Ala Leu Ala Ile Ile Gly Met  
 400 405 410 415

atc tgg ctg cgc cac aga aag cct gag ctt gag cgg ccc atc aag gtg 1358  
 Ile Trp Leu Arg His Arg Lys Pro Glu Leu Glu Arg Pro Ile Lys Val  
 420 425 430

aac ctg gcc ctg cct gtg ttc ttc atc ctg gcc tgc ctc ttc ctg atc 1406

Asn Leu Ala Leu Pro Val Phe Phe Ile Leu Ala Cys Leu Phe Leu Ile

435

440

445

gcc gtc tcc ttc tgg aag aca ccc gtg gag tgt ggc atc ggc ttc acc 1454

Ala Val Ser Phe Trp Lys Thr Pro Val Glu Cys Gly Ile Gly Phe Thr

450

455

460

atc atc ctc agc ggg ctg ccc gtc tac ttc ttc ggg gtc tgg tgg aaa 1502

Ile Ile Leu Ser Gly Leu Pro Val Tyr Phe Phe Gly Val Trp Trp Lys

465

470

475

aac aag ccc aag tgg ctc ctc cag ggc atc ttc tcc acg acc gtc ctg 1550

Asn Lys Pro Lys Trp Leu Leu Gln Gly Ile Phe Ser Thr Thr Val Leu

480

485

490

495

tgt cag aag ctc atg cag gtg gtc ccc cag gag aca tag ccaggaggcc 1599

Cys Gln Lys Leu Met Gln Val Val Pro Gln Glu Thr

500

505

gagtggctgc cggaggagca tgcgcagagg ccagttaaag tagatcacct cctcgaaccc 1659

actccgggttc cccgcaaccc acagctcagc tgcctatccc agtccctcgc cgtccctccc 1719

aggtcgggca gtggaggctg ctgtgaaaac tctggtacga atctcatccc tcaactgagg 1779

gccagggacc cagggtgtcc tgtgtcctg cccaggagca gcttttggtc tccctggggc 1839

ctttttccct tccctccctt gttaacttat atatatatt tttttaaac taaattttgg 1899

gicaaactlga caccactaag aigatttttt aaggagctgg gggaaggcag gagccttcc 1959

ttctctctgcc ccaagggccc agaccttggg caaacagagc tacigagact tggaaacctca 2019

ttgctacgac agacttgcac tgaagccgga cagctgcccac gacacatggg ctgttgacat 2079

tcttgaaaac caaccttgtg ggcttatgtc tctgcccttag ggtttgcaga gtggaaactc 2139

agccgtlaggg tggcactggg aggggggtggg ggatctgggc aaggigggtg attcctccca 2199

ggagggtgtt gagggcccga tggactctg acctataacc tagccccgag acaccatcct 2259

gagccaggga acagccccag ggttgggggg tgcggcatc tcccctagct caccaggcct 2319

ggcctctggg cagtggtggc tcttggctat ttctgttcca gttttggagg ctgagttctg 2379

gttcatgcag acaaagccct gtccctcagt ctcttagaaa cagagacaag aaaggcagac 2439

acaccgcggc caggcaccca tgtgggcgcc caccttgggc tccacacagc agtgctccct 2499

gccccagagg tgcagctac cctcagcctc caatgcattg gcctctgtac cgccccggcag 2559

ccccctctgg ccggtgtctg gtctccactc ccggcctagg caccctcccg ctctccctgt 2619

cacgtcatg tctgttctg gtctgatgc ccgttgtcta ggagacagag ccaagcacig 2679

ctcacgtctc tgcggcctgc gtttggaggc ccttgggctc tcacccagtc cccacccgcc 2739

tgcagagagg gaactlaggc accccttgtt tctgttgttc ccgtgaattt ttctcgctat 2799

gggaggcagc cgaggccagg ccaatgcggc ccacitccct gagcigtcgc tgcctccaatg 2859

gcagcagcca aggacccccca gaacaagaag acccccccgcc aggaicccctc ctgagctcgg 2919

ggggctctgc ctctcaggc cccgggcttc cctctccccc agccagaggt ggagccaagt 2979

ggtccagcgt cactccagtgc ctgagctgtg gctggaggag ctggcctgtg gcacagccct 3039

gagigtccca agccgggagc caacgaagcc ggacacggct tcactgacca gcggctgtctc 3099

aagccgcaag ctctcagcaa gtgcccagtg gagcctgccg cccccacctg ggcaccggga 3159

ccccctcacc atccagtggg cccggagaaa cctgatgaac agtttgggga ctgaggacca 3219

gatgtccgtc tctcttgctt gaggaatgaa gaccittatt caccctgcc ccgttgcttc 3279

ccgtgcaca tggacagact tcacagcgtc tgcctatagg acctgcatcc ttcctgggga 3339

cgaattccac tcttccaagg gacagccac ggtctggagg ccgaggacca ccagcaggca 3399

ggtggactga ctgtgttggg caagacctct tccctctggg ccgtttctct tggctgcaaa 3459

taaggacagc agctgggtgcc ccacctgccct ggtgcatatgc tgtgtgaatc caggaggcag 3519

tggacatcgt aggcagccac ggccccgggt ccaggagaag tgcctccctgg aggcacgcac 3579

cacigcttcc cacitggggcc ggccggggccc acgcacgacg tcagccctctt accttccgc 3639



ctcggclagg ggtccctcggg algccgttct gtccaacct cctgcctcgg gaggtggaca 3699

tgcccaagg atacaggag ccggcggcct ctcgacggca cgcacttgcc tgttggctgc 3759

tcgggctgtg ggcgagcatg ggggcgcga gcgtcgttg tggaaagtag ctgctagiga 3819

aatggctggg gccgcgggg tccgtctca cactgcgcag gtcctctcgt ggctcctgag 3879

ctggggctgg agctccctcg cagaaggctg gtggggggc cagctcgtga tccctggctg 3939

tgttgcccc acctcagcct ggggacccca ctccagaagg taggggccgt gtcccgcgt 3999

gtcactgag gccgtctcc cctcccccct cctgcctgctc tggaaatcca cagggaccag 4059

ggccaccgca ggggactgtc tcagaagact tgatttttcc gtccctttt ctccacactc 4119

cactgacaaa cgtcccccagc ggttccact tgtgggcttc aggtgtttc aagcacaacc 4179

caccacaaca agcaagtga ttctcagtc ttgtgccttt ttgttttgct ctaacgtctt 4239

actaatltaa agatgctgtc ggcaccaigt ttattttt ccagtggta tgcctcagcct 4299

tgcctcctg cgtggcgcag gtcctatgcc tgcctccctgt ctgtgtccca gccacgcagg 4359

gccatccact gtgacgtcgg ccgaccaggc tggacacct ctgccgagta atgacgtgtg 4419

tggctgggac ctcttttatt ctgtgttaa ggctaacctg ttacactggg ctgggttggg 4479

taggtgttc tggctttttt gtgggggttt tttttttaa gaaacactca atcatcctag 4539

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 507

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Ala Gly Ala Gly Pro Lys Arg Arg Ala Leu Ala Ala Pro Ala Ala

1

5

10

15

Glu Glu Lys Glu Glu Ala Arg Glu Lys Met Leu Ala Ala Lys Ser Ala

20

25

30

Asp Gly Ser Ala Pro Ala Gly Glu Gly Glu Gly Val Thr Leu Gln Arg

35

40

45

Asn Ile Thr Leu Leu Asn Gly Val Ala Ile Ile Val Gly Thr Ile Ile

50

55

60

Gly Ser Gly Ile Phe Val Thr Pro Thr Gly Val Leu Lys Glu Ala Gly

65

70

75

80

Ser Pro Gly Leu Ala Leu Val Val Trp Ala Ala Cys Gly Val Phe Ser

85

90

95

Ile Val Gly Ala Leu Cys Tyr Ala Glu Leu Gly Thr Thr Ile Ser Lys

100

105

110

Ser Gly Gly Asp Tyr Ala Tyr Met Leu Glu Val Tyr Gly Ser Leu Pro

115

120

125

Ala Phe Leu Lys Leu Trp Ile Glu Leu Leu Ile Ile Arg Pro Ser Ser

130

135

140

Gln Tyr Ile Val Ala Leu Val Phe Ala Thr Tyr Leu Leu Lys Pro Leu

145

150

155

160

Phe Pro Thr Cys Pro Val Pro Glu Glu Ala Ala Lys Leu Val Ala Cys

165

170

175

Leu Cys Val Leu Leu Leu Thr Ala Val Asn Cys Tyr Ser Val Lys Ala

180

185

190

Ala Thr Arg Val Gln Asp Ala Phe Ala Ala Ala Lys Leu Leu Ala Leu

195

200

205

Ala Leu Ile Ile Leu Leu Gly Phe Val Gln Ile Gly Lys Gly Asp Val

210

215

220

Ser Asn Leu Asp Pro Asn Phe Ser Phe Glu Gly Thr Lys Leu Asp Val

225

230

235

240

Gly Asn Ile Val Leu Ala Leu Tyr Ser Gly Leu Phe Ala Tyr Gly Gly

245

250

255

Trp Asn Tyr Leu Asn Phe Val Thr Glu Glu Met Ile Asn Pro Tyr Arg

260

265

270

Asn Leu Pro Leu Ala Ile Ile Ile Ser Leu Pro Ile Val Thr Leu Val

275

280

285

Tyr Val Leu Thr Asn Leu Ala Tyr Phe Thr Thr Leu Ser Thr Glu Gln

290

295

300

Met Leu Ser Ser Glu Ala Val Ala Val Asp Phe Gly Asn Tyr His Leu

305

310

315

320

Gly Val Met Ser Trp Ile Ile Pro Val Phe Val Gly Leu Ser Cys Phe

325

330

335

Gly Ser Val Asn Gly Ser Leu Phe Thr Ser Ser Arg Leu Phe Phe Val

340

345

350

Gly Ser Arg Glu Gly His Leu Pro Ser Ile Leu Ser Met Ile His Pro

355

360

365

Gln Leu Leu Thr Pro Val Pro Ser Leu Val Phe Thr Cys Val Met Thr

370

375

380

Leu Leu Tyr Ala Phe Ser Lys Asp Ile Phe Ser Val Ile Asn Phe Phe

385

390

395

400

Ser Phe Phe Asn Trp Leu Cys Val Ala Leu Ala Ile Ile Gly Met Ile

405

410

415

Trp Leu Arg His Arg Lys Pro Glu Leu Glu Arg Pro Ile Lys Val Asn

420

425

430

Leu Ala Leu Pro Val Phe Phe Ile Leu Ala Cys Leu Phe Leu Ile Ala

435

440

445

Val Ser Phe Trp Lys Thr Pro Val Glu Cys Gly Ile Gly Phe Thr Ile

450

455

460

Ile Leu Ser Gly Leu Pro Val Tyr Phe Phe Gly Val Trp Trp Lys Asn

465

470

475

480

Lys Pro Lys Trp Leu Leu Gln Gly Ile Phe Ser Thr Thr Val Leu Cys

485

490

495

Gln Lys Leu Met Gln Val Val Pro Gln Glu Thr

500

505

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 3455

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rat

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 5' UTR

&lt;222&gt; (1).. (63)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (64).. (1602)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 3' UTR

&lt;222&gt; (1603).. (3455)

&lt;400&gt; 3

cgcgagagc ggctcggccg cgcgcacgcc gggtatccag gccgagccgg gaacgtcgag 60

agc atg gcg gtc gcg ggc gca aag cgg cgc gcg gtt gcg gcc ccc gcg 108

Met Ala Val Ala Gly Ala Lys Arg Arg Ala Val Ala Ala Pro Ala

1

5

10

15

acg acg gcg gcg gag gag gag cgg cag gcg cgg gag aag atg ctg gag 156

Thr Thr Ala Ala Glu Glu Glu Arg Gln Ala Arg Glu Lys Met Leu Glu

20

25

30

gcg cgg cgc ggg gac ggc gcg gac ccc gag ggc gaa ggc glg acc ctg 204

Ala Arg Arg Gly Asp Gly Ala Asp Pro Glu Gly Glu Gly Val Thr Leu

35

40

45

cag cgc aat atc aca ctg atc aat ggt gtg gcc atc ata gtg ggc acc 252

Gln Arg Asn Ile Thr Leu Ile Asn Gly Val Ala Ile Ile Val Gly Thr

50

55

60

atc atc ggt tgc ggc atc ttc gtg acg ccc acc ggc gtg ctc aag gaa 300

Ile Ile Gly Ser Gly Ile Phe Val Thr Pro Thr Gly Val Leu Lys Glu

65

70

75

gcc ggc tgc ccc gga ctg tgc ctt gtg gtg tgg gct gtg tgc ggc gtc 348  
 Ala Gly Ser Pro Gly Leu Ser Leu Val Val Trp Ala Val Cys Gly Val  
 80 85 90 95

ttc tcc atc gtg ggc gca ctg tgc tac gcg gag ctg ggc act acc atc 396  
 Phe Ser Ile Val Gly Ala Leu Cys Tyr Ala Glu Leu Gly Thr Thr Ile  
 100 105 110

tca aag tca ggc ggc gac tat gcc tac atg cta gag gtc tac ggc tgc 444  
 Ser Lys Ser Gly Gly Asp Tyr Ala Tyr Met Leu Glu Val Tyr Gly Ser  
 115 120 125

ctg ccc gcc ttc ctc aag ctc tgg atc gag ctg ctc atc att cgg ccc 492  
 Leu Pro Ala Phe Leu Lys Leu Trp Ile Glu Leu Leu Ile Ile Arg Pro  
 130 135 140

tcc tca cag tac atc gtg gcg ctg gtc ttc gcc aca tac ctg ctc aag 540  
 Ser Ser Gln Tyr Ile Val Ala Leu Val Phe Ala Thr Tyr Leu Leu Lys  
 145 150 155

ccg gtc ttc ccc act tgt ccc gtg ccc gag gag gct gcc aag ctc gtc 588  
 Pro Val Phe Pro Thr Cys Pro Val Pro Glu Glu Ala Ala Lys Leu Val  
 160 165 170 175

gcc tgc ctc tgc gtg cta cta ctc acg gct gtg aac tgc tac agt gtc 636  
 Ala Cys Leu Cys Val Leu Leu Leu Thr Ala Val Asn Cys Tyr Ser Val  
 180 185 190

aag gct gct acc cgt gtg cag gat gcc ttt gcg gct gcc aaa ctg ctg 684

Lys Ala Ala Thr Arg Val Gln Asp Ala Phe Ala Ala Ala Lys Leu Leu

195

200

205

gcc ctg gcc ctg atc atc ctg ctg ggc ttc atc cag atg gga aag gac 732

Ala Leu Ala Leu Ile Ile Leu Leu Gly Phe Ile Gln Met Gly Lys Asp

210

215

220

ata gga caa ggg gat gca tcc aac ctg cac cag aag ttg tcc ttt gaa 780

Ile Gly Gln Gly Asp Ala Ser Asn Leu His Gln Lys Leu Ser Phe Glu

225

230

235

ggc acc aat ctg gac gtg ggg aac att gtg ttg gca ttg tac agt ggc 828

Gly Thr Asn Leu Asp Val Gly Asn Ile Val Leu Ala Leu Tyr Ser Gly

240

245

250

255

ctc ttc gcc tac gga gga tgg aac tat ctg aat ttt gtc acg gag gag 876

Leu Phe Ala Tyr Gly Gly Trp Asn Tyr Leu Asn Phe Val Thr Glu Glu

260

265

270

atg atc aac ccc tac agg aac ctc ccc ctg gcc atc atc atc tcc ttg 924

Met Ile Asn Pro Tyr Arg Asn Leu Pro Leu Ala Ile Ile Ile Ser Leu

275

280

285

ccc att gtc acc ctg gtc tat gtg ctg acg aac ctg gcc tac ttc act 972

Pro Ile Val Thr Leu Val Tyr Val Leu Thr Asn Leu Ala Tyr Phe Thr

290

295

300

acc ctg tct acc aac cag atg ctg aca tct gaa gcc gtg gct gtg gat 1020

Thr Leu Ser Thr Asn Gln Met Leu Thr Ser Glu Ala Val Ala Val Asp



305 310 315  
 ttt ggg aac tac cac ctg gga gtc atg tcc tgg atc att cct gtc ttc 1068  
 Phe Gly Asn Tyr His Leu Gly Val Met Ser Trp Ile Ile Pro Val Phe  
 320 325 330 335

glg ggc ttg tcc tgc ttc ggc tct gtc aat ggg tct ctg ttc acg tcc 1116  
 Val Gly Leu Ser Cys Phe Gly Ser Val Asn Gly Ser Leu Phe Thr Ser  
 340 345 350

tca aga ctg ttc ttc gtg gga tcc agg gag ggc cac ctg cct tcc atc 1164  
 Ser Arg Leu Phe Phe Val Gly Ser Arg Glu Gly His Leu Pro Ser Ile  
 355 360 365

ctc tcc atg atc cac cca cag ctt ctg aca ccg gtg cca tca ctg gtg 1212  
 Leu Ser Met Ile His Pro Gln Leu Leu Thr Pro Val Pro Ser Leu Val  
 370 375 380

ttc acg tgt gtc atg acc ctg atg tac gcc ttc tcc aga gac atc ttc 1260  
 Phe Thr Cys Val Met Thr Leu Met Tyr Ala Phe Ser Arg Asp Ile Phe  
 385 390 395

tcc atc atc aac ttc ttc agc ttc ttc aac tgg ctg tgt gtg gcc ctg 1308  
 Ser Ile Ile Asn Phe Phe Ser Phe Phe Asn Trp Leu Cys Val Ala Leu  
 400 405 410 415

gcc atc atc ggc atg atg tgg ctc cgc ttt aag aag cct gag ctg gag 1356  
 Ala Ile Ile Gly Met Met Trp Leu Arg Phe Lys Lys Pro Glu Leu Glu  
 420 425 430

cgt ccc atc aag glg aat ctg gcc ctc cca glg ttc ttt atc ctg gcc 1404

Arg Pro Ile Lys Val Asn Leu Ala Leu Pro Val Phe Phe Ile Leu Ala

435

440

445

igc ctc ttc ctc atc gcc gtg tcc ttc tgg aag aca ccc ctg gag tgc 1452

Cys Leu Phe Leu Ile Ala Val Ser Phe Trp Lys Thr Pro Leu Glu Cys

450

455

460

ggc att ggc ttc gcc atc atc ctc agc ggg ctg cct glc tac ttc ttt 1500

Gly Ile Gly Phe Ala Ile Ile Leu Ser Gly Leu Pro Val Tyr Phe Phe

465

470

475

ggt gtg tgg tgg aaa aac aag ccc aaa tgg atc ctg cag gtc atc ttc 1548

Gly Val Trp Trp Lys Asn Lys Pro Lys Trp Ile Leu Gln Val Ile Phe

480

485

490

495

tcc gtg acc gtg ctc tgc cag aag ctg atg cag gtg gtt cct cag gag 1596

Ser Val Thr Val Leu Cys Gln Lys Leu Met Gln Val Val Pro Gln Glu

500

505

510

act tag ccacgtgtcc tgggtgccgc gggagagtgc actgtgactg ctccagaca 1652

Thr

actcaccitt ggaaaagcag cgiccaggcc cgicalcccc acagctccag tgagcaccac 1712

taactatctt aacaccatcc gcgtgccctc aaaggtcagg tgtccacagt ggccgtgaaa 1772

gaaacctggt acgaatttgg tcccagatgg tgaccaacca tgcatacata gcagccactg 1832

tgagggtgigc tglggcctga ggccctggctc ttcctgacttt ggggactgcc acatctgggc 1892

ttctccctct atgatttttt gttttgtttt tgtagcgltc attlgggtca agttlacact 1952

accgagatga ttattttttg acaaaacagg gtagcaaaga gcaggagatg gtgtggccgg 2012

acagtcgggc tctgagtggg aactgcaggc cacagctctt ctcgactgt tgttcgttca 2072

gtagcacatt gtggctggag gggaccacat cactgtcacc aagtcagaac tactgagact 2132

caaacaacac ctcttccact gtggacttgc actgacaaac ggacgatgaa tgtgctagct 2192

tgggtttgag ttctctgggt ctgtcctaga gatgaaaccc caaccigacc cagaggcag 2252

agctctactg tgggtcatll gtccattgt aaatgcagag ctcgggtctg accactctga 2312

agtcctggig attccccctc ccttggctcc aaatgaaaga cctctgcagc cataacccta 2372

gtggcaccig gccaccaact gtcaactgcg gggccatgtg ctccctgtga cacaagctgg 2432

ctctacacat tcaaggggca ctgctctggg tcttactccc tglcccaccc cagctctcct 2492

agaaccagac cggcaccatg gggctccacc acacacctct gtccacctcc ataattcctg 2552

agactgctag cagctctctg tcaagtcacc accgtccccc ctacagcccc cgggccactg 2612

ttcaaaagaa taggcaccaa ctacccttct gctctctgcc accgtgtgga cgtgaccact 2672

ccagciccc t gagcgtgaaa actgcctggc acgtgcctgc gicccicctg tctgggacca 2732

gtctgttccg gggagacggt ttagtccagc agcacatcca ctgaagcagc tgatctgact 2792

gaaggacttg agggcatgag aatccccgc tggcccttcc atgacctag agctggcctc 2852

ccctaggggg tctcaacttg agtctctact gtaagctct tacaatagg caccctgata 2912

tctccctggg tccccctgt tgggggtgag gaggcagagg tcaaggctag agtgccctta 2972

gaaggctctc cagagaatg aactcaggc cccagacaca agccctgggtt caaagggcag 3032

ggcaagtctt ggtccacgtt catggctgc acccaggccc tctgagaagg cctgtctatt 3092

ccctatttga tctcctgagg acgcccactt gtaggttttt ggttttaaat caagccacag 3152

ccacagtcat tggcccaat gcttgcatt gtgtgtcct aacacatcac tgcctctggt 3212

aacccccctg cctggccctt ttcagtggc agtctccagt gctgggtacg gtgtgttccc 3272

accacacttg gtcaccctgc tctgccactg gacttagtgc tctgggtgta atgtctttta 3332

ctattgtatt aatgactagt ctgttacatt agactggggg tgggtgcaa ggtctgtctg 3392

gtttgtgagg ctttttgatt ggggggggtg ttgtttttt ttttttaaag ctattggagt 3452

tct

3455

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 512

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 4

Met Ala Val Ala Gly Ala Lys Arg Arg Ala Val Ala Ala Pro Ala Thr

1 5 10 15

Thr Ala Ala Glu Glu Glu Arg Gln Ala Arg Glu Lys Met Leu Glu Ala

20 25 30

Arg Arg Gly Asp Gly Ala Asp Pro Glu Gly Glu Gly Val Thr Leu Gln

35 40 45

Arg Asn Ile Thr Leu Ile Asn Gly Val Ala Ile Ile Val Gly Thr Ile

50 55 60

Ile Gly Ser Gly Ile Phe Val Thr Pro Thr Gly Val Leu Lys Glu Ala

65 70 75 80

Gly Ser Pro Gly Leu Ser Leu Val Val Trp Ala Val Cys Gly Val Phe

85 90 95

Ser Ile Val Gly Ala Leu Cys Tyr Ala Glu Leu Gly Thr Thr Ile Ser

100 105 110

Lys Ser Gly Gly Asp Tyr Ala Tyr Met Leu Glu Val Tyr Gly Ser Leu

115 120 125

Pro Ala Phe Leu Lys Leu Trp Ile Glu Leu Leu Ile Ile Arg Pro Ser

130

135

140

Ser Gln Tyr Ile Val Ala Leu Val Phe Ala Thr Tyr Leu Leu Lys Pro

145

150

155

160

Val Phe Pro Thr Cys Pro Val Pro Glu Glu Ala Ala Lys Leu Val Ala

165

170

175

Cys Leu Cys Val Leu Leu Leu Thr Ala Val Asn Cys Tyr Ser Val Lys

180

185

190

Ala Ala Thr Arg Val Gln Asp Ala Phe Ala Ala Ala Lys Leu Leu Ala

195

200

205

Leu Ala Leu Ile Ile Leu Leu Gly Phe Ile Gln Met Gly Lys Asp Ile

210

215

220

Gly Gln Gly Asp Ala Ser Asn Leu His Gln Lys Leu Ser Phe Glu Gly

225

230

235

240

Thr Asn Leu Asp Val Gly Asn Ile Val Leu Ala Leu Tyr Ser Gly Leu

245

250

255

Phe Ala Tyr Gly Gly Trp Asn Tyr Leu Asn Phe Val Thr Glu Glu Met

260

265

270

Ile Asn Pro Tyr Arg Asn Leu Pro Leu Ala Ile Ile Ile Ser Leu Pro

275                      280                      285

Ile Val Thr Leu Val Tyr Val Leu Thr Asn Leu Ala Tyr Phe Thr Thr  
290                      295                      300

Leu Ser Thr Asn Gln Met Leu Thr Ser Glu Ala Val Ala Val Asp Phe  
305                      310                      315                      320

Gly Asn Tyr His Leu Gly Val Met Ser Trp Ile Ile Pro Val Phe Val  
325                      330                      335

Gly Leu Ser Cys Phe Gly Ser Val Asn Gly Ser Leu Phe Thr Ser Ser  
340                      345                      350

Arg Leu Phe Phe Val Gly Ser Arg Glu Gly His Leu Pro Ser Ile Leu  
355                      360                      365

Ser Met Ile His Pro Gln Leu Leu Thr Pro Val Pro Ser Leu Val Phe  
370                      375                      380

Thr Cys Val Met Thr Leu Met Tyr Ala Phe Ser Arg Asp Ile Phe Ser  
385                      390                      395                      400

Ile Ile Asn Phe Phe Ser Phe Phe Asn Trp Leu Cys Val Ala Leu Ala  
405                      410                      415

Ile Ile Gly Met Met Trp Leu Arg Phe Lys Lys Pro Glu Leu Glu Arg  
420                      425                      430

Pro Ile Lys Val Asn Leu Ala Leu Pro Val Phe Phe Ile Leu Ala Cys

435

440

445

Leu Phe Leu Ile Ala Val Ser Phe Trp Lys Thr Pro Leu Glu Cys Gly

450

455

460

Ile Gly Phe Ala Ile Ile Leu Ser Gly Leu Pro Val Tyr Phe Phe Gly

465

470

475

480

Val Trp Trp Lys Asn Lys Pro Lys Trp Ile Leu Gln Val Ile Phe Ser

485

490

495

Val Thr Val Leu Cys Gln Lys Leu Met Gln Val Val Pro Gln Glu Thr

500

505

510

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1863

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 5' UTR

&lt;222&gt; (1).. (109)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (110).. (1699)



&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 3' UTR

&lt;222&gt; (1700).. (1863)

&lt;400&gt; 5

gcgcggagcc acagaggccg gggagagcgt tctgggtccg aggggtccagg taggggttga 60

gccaccaict gaccgcaagc tgcgtcgtgt cgccgggtict gcaggcacc atg agc cag 118

Met Ser Gln

1

gac acc gag gtg gat atg aag gag gtg gag ctg aat gag tta gag ccc 166

Asp Thr Glu Val Asp Met Lys Glu Val Glu Leu Asn Glu Leu Glu Pro

5

10

15

gag aag cag ccg atg aac gcg gcg tct ggg gcg gcc atg tcc ctg gcg 214

Glu Lys Gln Pro Met Asn Ala Ala Ser Gly Ala Ala Met Ser Leu Ala

20

25

30

35

gga gcc gag aag aat ggt ctg gtg aag atc aag gtg gcg gaa gac gag 262

Gly Ala Glu Lys Asn Gly Leu Val Lys Ile Lys Val Ala Glu Asp Glu

40

45

50

gcg gag gcg gca gcc gcg gct aag ttc acg ggc ctg tcc aag gag gag 310

Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Lys Phe Thr Gly Leu Ser Lys Glu Glu

55

60

65

ctg ctg aag gtg gca ggc agc ccc ggc tgg gla cgc acc cgc tgg gca 358

Leu Leu Lys Val Ala Gly Ser Pro Gly Trp Val Arg Thr Arg Trp Ala

70

75

80

ctg ctg ctg ctc ttc tgg ctc ggc tgg ctc ggc atg ctt gct ggt gcc 406

Leu Leu Leu Leu Phe Trp Leu Gly Trp Leu Gly Met Leu Ala Gly Ala

85

90

95

gtg gtc ata atc gtg cga gcg ccg cgt tgt cgc gag cta ccg gcg cag 454

Val Val Ile Ile Val Arg Ala Pro Arg Cys Arg Glu Leu Pro Ala Gln

100

105

110

115

aag tgg tgg cac acg ggc gcc ctc tac cgc atc ggc gac ctt cag gcc 502

Lys Trp Trp His Thr Gly Ala Leu Tyr Arg Ile Gly Asp Leu Gln Ala

120

125

130

ttc cag ggc cac ggc gcg ggc aac ctg gcg ggt ctg aag ggg cgt ctc 550

Phe Gln Gly His Gly Ala Gly Asn Leu Ala Gly Leu Lys Gly Arg Leu

135

140

145

gat tac ctg agc tct ctg aag gtg aag ggc ctt gtg ctg ggt cca att 598

Asp Tyr Leu Ser Ser Leu Lys Val Lys Gly Leu Val Leu Gly Pro Ile

150

155

160

cac aag aac cag aag gat gat gtc gct cag act gac ttg ctg cag atc 646

His Lys Asn Gln Lys Asp Asp Val Ala Gln Thr Asp Leu Leu Gln Ile

165

170

175

gac ccc aat ttt ggc tcc aag gaa gat ttt gac agt ctc ttg caa tgc 694

Asp Pro Asn Phe Gly Ser Lys Glu Asp Phe Asp Ser Leu Leu Gln Ser

180

185

190

195

gct aaa aaa aag agc atc cgt gtc att ctg gac ctt act ccc aac tac 742

Ala Lys Lys Lys Ser Ile Arg Val Ile Leu Asp Leu Thr Pro Asn Tyr

200

205

210

cgg ggt gag aac tcg tgg ttc tcc act cag gtt gac act gtg gcc acc 790

Arg Gly Glu Asn Ser Trp Phe Ser Thr Gln Val Asp Thr Val Ala Thr

215

220

225

aag gtg aag gat gct ctg gag ttt tgg ctg caa gct ggc gtg gat ggg 838

Lys Val Lys Asp Ala Leu Glu Phe Trp Leu Gln Ala Gly Val Asp Gly

230

235

240

ttc cag gtt cgg gac ata gag aat ctg aag gat gca tcc tca ttc ttg 886

Phe Gln Val Arg Asp Ile Glu Asn Leu Lys Asp Ala Ser Ser Phe Leu

245

250

255

gct gag tgg caa aat atc acc aag ggc ttc agt gaa gac agg ctc ttg 934

Ala Glu Trp Gln Asn Ile Thr Lys Gly Phe Ser Glu Asp Arg Leu Leu

260

265

270

275

att gcg ggg act aac tcc tcc gac ctt cag cag atc ctg agc cta ctc 982

Ile Ala Gly Thr Asn Ser Ser Asp Leu Gln Gln Ile Leu Ser Leu Leu

280

285

290

gaa tcc aac aaa gac ttg ctg ttg act agc tca tac ctg tct gat tct 1030

Glu Ser Asn Lys Asp Leu Leu Leu Thr Ser Ser Tyr Leu Ser Asp Ser

295

300

305

ggc tct act ggg gag cat aca aaa tcc cta gtc aca cag tat ttg aat 1078

Gly Ser Thr Gly Glu His Thr Lys Ser Leu Val Thr Gln Tyr Leu Asn

310

315

320

gcc act ggc aat cgc tgg tgc agc tgg agt ttg tct cag gca agg ctc 1126

Ala Thr Gly Asn Arg Trp Cys Ser Trp Ser Leu Ser Gln Ala Arg Leu

325

330

335

cig act tcc ttc ttg ccg gct caa ctt ctc cga ctc tac cag ctg atg 1174

Leu Thr Ser Phe Leu Pro Ala Gln Leu Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Met

340

345

350

355

ctc ttc acc ctg cca ggg acc cct gtt ttc agc tac ggg gat gag att 1222

Leu Phe Thr Leu Pro Gly Thr Pro Val Phe Ser Tyr Gly Asp Glu Ile

360

365

370

ggc ctg gat gca gct gcc ctt cct gga cag cct atg gag gct cca gtc 1270

Gly Leu Asp Ala Ala Ala Leu Pro Gly Gln Pro Met Glu Ala Pro Val

375

380

385

atg ctg tgg gat gag tcc agc ttc cct gac atc cca ggg gct gta agt 1318

Met Leu Trp Asp Glu Ser Ser Phe Pro Asp Ile Pro Gly Ala Val Ser

390

395

400

gcc aac atg act gtc aag ggc cag agt gaa gac cct ggc tcc ctc ctt 1366

Ala Asn Met Thr Val Lys Gly Gln Ser Glu Asp Pro Gly Ser Leu Leu

405

410

415

tcc ttg ttc cgg cgg ctg agt gac cag cgg agt aag gag cgc tcc cta 1414

Ser Leu Phe Arg Arg Leu Ser Asp Gln Arg Ser Lys Glu Arg Ser Leu  
 420 425 430 435

ctg cat ggg gac ttc cac gcg ttc tcc gct ggg cct gga ctc ttc tcc 1462  
 Leu His Gly Asp Phe His Ala Phe Ser Ala Gly Pro Gly Leu Phe Ser  
 440 445 450

tat atc cgc cac tgg gac cag aat gag cgt ttt ctg gla gtg ctt aac 1510  
 Tyr Ile Arg His Trp Asp Gln Asn Glu Arg Phe Leu Val Val Leu Asn  
 455 460 465

ttt ggg gat gtg ggc ctc tcg gct gga ctg cag gcc tcc gac ctg cct 1558  
 Phe Gly Asp Val Gly Leu Ser Ala Gly Leu Gln Ala Ser Asp Leu Pro  
 470 475 480

gcc agc gcc agc ctc cca gcc aag gct gac ctc ctg ctc agc acc cag 1606  
 Ala Ser Ala Ser Leu Pro Ala Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ser Thr Gln  
 485 490 495

cca ggc cgt gag gag ggc tcc cct ctt gag ctg gaa cgc ctg aaa ctg 1654  
 Pro Gly Arg Glu Glu Gly Ser Pro Leu Glu Leu Glu Arg Leu Lys Leu  
 500 505 510 515

gag cct cac gaa ggg ctg ctg ctc cgc ttc ccc tac gcg gcc tga 1699  
 Glu Pro His Glu Gly Leu Leu Leu Arg Phe Pro Tyr Ala Ala  
 520 525 530

cttcagccctg acatggaccc actacccttc tcccttcctt cccaggccct ttggttctga 1759

tttttctt ttttaaaaac aaacaaacaa actgttcag attatgagt aacccccaaa 1819

taggtgttt tctgccitca aataaaagtc acccctgcat ggtg 1863

<210> 6

<211> 529

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ser Gln Asp Thr Glu Val Asp Met Lys Glu Val Glu Leu Asn Glu

1

5

10

15

Leu Glu Pro Glu Lys Gln Pro Met Asn Ala Ala Ser Gly Ala Ala Met

20

25

30

Ser Leu Ala Gly Ala Glu Lys Asn Gly Leu Val Lys Ile Lys Val Ala

35

40

45

Glu Asp Glu Ala Glu Ala Ala Ala Ala Lys Phe Thr Gly Leu Ser

50

55

60

Lys Glu Glu Leu Leu Lys Val Ala Gly Ser Pro Gly Trp Val Arg Thr

65

70

75

80

Arg Trp Ala Leu Leu Leu Leu Phe Trp Leu Gly Trp Leu Gly Met Leu

85

90

95

Ala Gly Ala Val Val Ile Ile Val Arg Ala Pro Arg Cys Arg Glu Leu  
100 105 110

Pro Ala Gln Lys Trp Trp His Thr Gly Ala Leu Tyr Arg Ile Gly Asp  
115 120 125

Leu Gln Ala Phe Gln Gly His Gly Ala Gly Asn Leu Ala Gly Leu Lys  
130 135 140

Gly Arg Leu Asp Tyr Leu Ser Ser Leu Lys Val Lys Gly Leu Val Leu  
145 150 155 160

Gly Pro Ile His Lys Asn Gln Lys Asp Asp Val Ala Gln Thr Asp Leu  
165 170 175

Leu Gln Ile Asp Pro Asn Phe Gly Ser Lys Glu Asp Phe Asp Ser Leu  
180 185 190

Leu Gln Ser Ala Lys Lys Lys Ser Ile Arg Val Ile Leu Asp Leu Thr  
195 200 205

Pro Asn Tyr Arg Gly Glu Asn Ser Trp Phe Ser Thr Gln Val Asp Thr  
210 215 220

Val Ala Thr Lys Val Lys Asp Ala Leu Glu Phe Trp Leu Gln Ala Gly  
225 230 235 240

Val Asp Gly Phe Gln Val Arg Asp Ile Glu Asn Leu Lys Asp Ala Ser  
245 250 255

Ser Phe Leu Ala Glu Trp Gln Asn Ile Thr Lys Gly Phe Ser Glu Asp

260

265

270

Arg Leu Leu Ile Ala Gly Thr Asn Ser Ser Asp Leu Gln Gln Ile Leu

275

280

285

Ser Leu Leu Glu Ser Asn Lys Asp Leu Leu Leu Thr Ser Ser Tyr Leu

290

295

300

Ser Asp Ser Gly Ser Thr Gly Glu His Thr Lys Ser Leu Val Thr Gln

305

310

315

320

Tyr Leu Asn Ala Thr Gly Asn Arg Trp Cys Ser Trp Ser Leu Ser Gln

325

330

335

Ala Arg Leu Leu Thr Ser Phe Leu Pro Ala Gln Leu Leu Arg Leu Tyr

340

345

350

Gln Leu Met Leu Phe Thr Leu Pro Gly Thr Pro Val Phe Ser Tyr Gly

355

360

365

Asp Glu Ile Gly Leu Asp Ala Ala Ala Leu Pro Gly Gln Pro Met Glu

370

375

380

Ala Pro Val Met Leu Trp Asp Glu Ser Ser Phe Pro Asp Ile Pro Gly

385

390

395

400

Ala Val Ser Ala Asn Met Thr Val Lys Gly Gln Ser Glu Asp Pro Gly



405

410

415

Ser Leu Leu Ser Leu Phe Arg Arg Leu Ser Asp Gln Arg Ser Lys Glu

420

425

430

Arg Ser Leu Leu His Gly Asp Phe His Ala Phe Ser Ala Gly Pro Gly

435

440

445

Leu Phe Ser Tyr Ile Arg His Trp Asp Gln Asn Glu Arg Phe Leu Val

450

455

460

Val Leu Asn Phe Gly Asp Val Gly Leu Ser Ala Gly Leu Gln Ala Ser

465

470

475

480

Asp Leu Pro Ala Ser Ala Ser Leu Pro Ala Lys Ala Asp Leu Leu Leu

485

490

495

Ser Thr Gln Pro Gly Arg Glu Glu Gly Ser Pro Leu Glu Leu Glu Arg

500

505

510

Leu Lys Leu Glu Pro His Glu Gly Leu Leu Leu Arg Phe Pro Tyr Ala

515

520

525

Ala

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1797

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rat

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 5' UTR

&lt;222&gt; (1).. (19)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (20).. (1603)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 3' UTR

&lt;222&gt; (1604).. (1797)

&lt;400&gt; 7

cgatgctgic gcaggtacc atg agc cag gac acc gaa gtg gac atg aaa gat 52

Met Ser Gln Asp Thr Glu Val Asp Met Lys Asp

1

5

10

gtg gag ctg aac gag ctg gaa ccg gag aag cag cct atg aat gca gcg 100

Val Glu Leu Asn Glu Leu Glu Pro Glu Lys Gln Pro Met Asn Ala Ala

15

20

25

gac ggg gcg gca gcc ggg gag aag aac ggt ctg gtg aag att aag gtg 148

Asp Gly Ala Ala Ala Gly Glu Lys Asn Gly Leu Val Lys Ile Lys Val

30

35

40

gcc gaa gac gag gcg gaa gcc ggg gtc aag ttc aca ggc tta tcc aag 196

Ala Glu Asp Glu Ala Glu Ala Gly Val Lys Phe Thr Gly Leu Ser Lys

45	50	55	
gag gag cta ttg aag gta gct ggc agc ccg ggc tgg gtg cgc acc cgc			244
Glu Glu Leu Leu Lys Val Ala Gly Ser Pro Gly Trp Val Arg Thr Arg			
60	65	70	75
tgg gcg ctg ctg ctg ctc ttc tgg ctc ggt tgg ctg ggt atg ctg gcg			292
Trp Ala Leu Leu Leu Leu Phe Trp Leu Gly Trp Leu Gly Met Leu Ala			
80	85	90	
ggc gcc gtg gtt atc atc gtt cgg gcg cca cgc tgc cgt gag ctg ccg			340
Gly Ala Val Val Ile Ile Val Arg Ala Pro Arg Cys Arg Glu Leu Pro			
95	100	105	
gta cag aga tgg tgg cac aag ggc gcc ctc tac cgc atc ggc gac ctt			388
Val Gln Arg Trp Trp His Lys Gly Ala Leu Tyr Arg Ile Gly Asp Leu			
110	115	120	
cag gcc ttc gta ggc ccg gaa gcg aga ggc ata gct ggt ctg aag aac			436
Gln Ala Phe Val Gly Pro Glu Ala Arg Gly Ile Ala Gly Leu Lys Asn			
125	130	135	
cat ctg gag tac ttg agc acc ctg aag gtg aag ggc cta gtt ttg ggc			484
His Leu Glu Tyr Leu Ser Thr Leu Lys Val Lys Gly Leu Val Leu Gly			
140	145	150	155
cca att cac aag aac cag aag gat gaa gtc aat gaa acc gac ttg aaa			532
Pro Ile His Lys Asn Gln Lys Asp Glu Val Asn Glu Thr Asp Leu Lys			
160	165	170	

cag att gat ccc gat tta ggc tcc cag gaa gat ttt aaa gac ctt cta 580

Gln Ile Asp Pro Asp Leu Gly Ser Gln Glu Asp Phe Lys Asp Leu Leu

175

180

185

caa agt gcc aag aaa aag agc att cac atc att ttg gac ctc act ccc 628

Gln Ser Ala Lys Lys Lys Ser Ile His Ile Ile Leu Asp Leu Thr Pro

190

195

200

aac tat aag ggc cag aat gca tgg ttc ctc cct cct cag gct gac att 676

Asn Tyr Lys Gly Gln Asn Ala Trp Phe Leu Pro Pro Gln Ala Asp Ile

205

210

215

gta gcc acc aaa atg aag gag gct ctg agt tct tgg ttg cag gac ggt 724

Val Ala Thr Lys Met Lys Glu Ala Leu Ser Ser Trp Leu Gln Asp Gly

220

225

230

235

gtg gat ggg ttc caa gtt cgg gat gtg gga aag ctg gcg aat gca tcc 772

Val Asp Gly Phe Gln Val Arg Asp Val Gly Lys Leu Ala Asn Ala Ser

240

245

250

ttg tac ttg gct gag tgg cag aat atc acc aag aac ttc agt gag gac 820

Leu Tyr Leu Ala Glu Trp Gln Asn Ile Thr Lys Asn Phe Ser Glu Asp

255

260

265

agg ctt ttg att gca ggg acc gcg tcc tct gac ctg caa caa att gtc 868

Arg Leu Leu Ile Ala Gly Thr Ala Ser Ser Asp Leu Gln Gln Ile Val

270

275

280

aac ala ctt gaa tcc acc agc gat ctg ctg ctg acc agc tca tac ctg 916  
 Asn Ile Leu Glu Ser Thr Ser Asp Leu Leu Leu Thr Ser Ser Tyr Leu

285

290

295

tca cag ccc gtt ttc act ggg gag cat gca gaa ctc cta gtg att aag 964  
 Ser Gln Pro Val Phe Thr Gly Glu His Ala Glu Leu Leu Val Ile Lys

300

305

310

315

tat ttg aat gcc act ggc agc cgc tgg tgc agc tgg agt gtg tgc cag 1012  
 Tyr Leu Asn Ala Thr Gly Ser Arg Trp Cys Ser Trp Ser Val Ser Gln

320

325

330

gca gga ctc ctg aca tcc ttt ata ccg gct cag ttt ctc cga ctc tac 1060  
 Ala Gly Leu Leu Thr Ser Phe Ile Pro Ala Gln Phe Leu Arg Leu Tyr

335

340

345

cag ctg ctg ctc ttc act ctg cca gga act cct gtt ttc agc tat ggg 1108  
 Gln Leu Leu Leu Phe Thr Leu Pro Gly Thr Pro Val Phe Ser Tyr Gly

350

355

360

gat gag ctt ggc ctt cag gca gtt gcc ctt cct gga cag cct atg gag 1156  
 Asp Glu Leu Gly Leu Gln Ala Val Ala Leu Pro Gly Gln Pro Met Glu

365

370

375

gct cca ttc atg ctg tgg aat gag tct agc aac tcc caa acc tca agt 1204  
 Ala Pro Phe Met Leu Trp Asn Glu Ser Ser Asn Ser Gln Thr Ser Ser

380

385

390

395

cct gta agc ctc aac atg aca gtg aag ggc caa aat gaa gac ccc ggc 1252

Pro Val Ser Leu Asn Met Thr Val Lys Gly Gln Asn Glu Asp Pro Gly

400

405

410

tcc ctc ctc acc cag ttc cgg cga ctg agt gac ctc cgt ggt aag gag 1300

Ser Leu Leu Thr Gln Phe Arg Arg Leu Ser Asp Leu Arg Gly Lys Glu

415

420

425

cgc tct ctg tta cac ggt gac ttt gat gca ctg tct tcc tca tct ggg 1348

Arg Ser Leu Leu His Gly Asp Phe Asp Ala Leu Ser Ser Ser Ser Gly

430

435

440

ctc ttc tcc tac gtc cgc cac tgg gac cag aat gag cgt tac ctg gtg 1396

Leu Phe Ser Tyr Val Arg His Trp Asp Gln Asn Glu Arg Tyr Leu Val

445

450

455

gtg ctc aac ttc cag gat gtg ggc ctg tca gcc agg gta gga gcc tcc 1444

Val Leu Asn Phe Gln Asp Val Gly Leu Ser Ala Arg Val Gly Ala Ser

460

465

470

475

aac ctc cct gct ggc ata agc ctg cca gcc agt gct aac ctt ttg ctt 1492

Asn Leu Pro Ala Gly Ile Ser Leu Pro Ala Ser Ala Asn Leu Leu Leu

480

485

490

agt act gac agc acc cgg cta agc cgt gag gag ggc acc tcc ctg agc 1540

Ser Thr Asp Ser Thr Arg Leu Ser Arg Glu Glu Gly Thr Ser Leu Ser

495

500

505

ctg gaa aac ctg agc ctg aat cct tat gag ggc ttg ttg tta cag ttc 1588

Leu Glu Asn Leu Ser Leu Asn Pro Tyr Glu Gly Leu Leu Leu Gln Phe

510

515

520

cc1 i11 g1g gcc tga tccctctaca cagaacctgc cacccttctt tccctctca 1643

Pro Phe Val Ala

525

ggcctt1gga attctgg1ct t1ctctcc1t attt1gt1t1 tgt1t1t1aaa cttt1gcaga 1703

ttacatatga attcttacac tgggggt1t1 tgt1t1t1caaa ataaaaaaaa tcacccctaa 1763

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa

1797

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 527

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 8

Met Ser Gln Asp Thr Glu Val Asp Met Lys Asp Val Glu Leu Asn Glu

1

5

10

15

Leu Glu Pro Glu Lys Gln Pro Met Asn Ala Ala Asp Gly Ala Ala Ala

20

25

30

Gly Glu Lys Asn Gly Leu Val Lys Ile Lys Val Ala Glu Asp Glu Ala

35

40

45

Glu Ala Gly Val Lys Phe Thr Gly Leu Ser Lys Glu Glu Leu Leu Lys

50

55

60

Val Ala Gly Ser Pro Gly Trp Val Arg Thr Arg Trp Ala Leu Leu Leu

65

70

75

80

Leu Phe Trp Leu Gly Trp Leu Gly Met Leu Ala Gly Ala Val Val Ile

85

90

95

Ile Val Arg Ala Pro Arg Cys Arg Glu Leu Pro Val Gln Arg Trp Trp

100

105

110

His Lys Gly Ala Leu Tyr Arg Ile Gly Asp Leu Gln Ala Phe Val Gly

115

120

125

Pro Glu Ala Arg Gly Ile Ala Gly Leu Lys Asn His Leu Glu Tyr Leu

130

135

140

Ser Thr Leu Lys Val Lys Gly Leu Val Leu Gly Pro Ile His Lys Asn

145

150

155

160

Gln Lys Asp Glu Val Asn Glu Thr Asp Leu Lys Gln Ile Asp Pro Asp

165

170

175

Leu Gly Ser Gln Glu Asp Phe Lys Asp Leu Leu Gln Ser Ala Lys Lys

180

185

190

Lys Ser Ile His Ile Ile Leu Asp Leu Thr Pro Asn Tyr Lys Gly Gln

195

200

205



Asn Ala Trp Phe Leu Pro Pro Gln Ala Asp Ile Val Ala Thr Lys Met

210

215

220

Lys Glu Ala Leu Ser Ser Trp Leu Gln Asp Gly Val Asp Gly Phe Gln

225

230

235

240

Val Arg Asp Val Gly Lys Leu Ala Asn Ala Ser Leu Tyr Leu Ala Glu

245

250

255

Trp Gln Asn Ile Thr Lys Asn Phe Ser Glu Asp Arg Leu Leu Ile Ala

260

265

270

Gly Thr Ala Ser Ser Asp Leu Gln Gln Ile Val Asn Ile Leu Glu Ser

275

280

285

Thr Ser Asp Leu Leu Leu Thr Ser Ser Tyr Leu Ser Gln Pro Val Phe

290

295

300

Thr Gly Glu His Ala Glu Leu Leu Val Ile Lys Tyr Leu Asn Ala Thr

305

310

315

320

Gly Ser Arg Trp Cys Ser Trp Ser Val Ser Gln Ala Gly Leu Leu Thr

325

330

335

Ser Phe Ile Pro Ala Gln Phe Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Leu Leu Phe

340

345

350

Thr Leu Pro Gly Thr Pro Val Phe Ser Tyr Gly Asp Glu Leu Gly Leu

355

360

365

Gln Ala Val Ala Leu Pro Gly Gln Pro Met Glu Ala Pro Phe Met Leu  
370 375 380

Trp Asn Glu Ser Ser Asn Ser Gln Thr Ser Ser Pro Val Ser Leu Asn  
385 390 395 400

Met Thr Val Lys Gly Gln Asn Glu Asp Pro Gly Ser Leu Leu Thr Gln  
405 410 415

Phe Arg Arg Leu Ser Asp Leu Arg Gly Lys Glu Arg Ser Leu Leu His  
420 425 430

Gly Asp Phe Asp Ala Leu Ser Ser Ser Ser Gly Leu Phe Ser Tyr Val  
435 440 445

Arg His Trp Asp Gln Asn Glu Arg Tyr Leu Val Val Leu Asn Phe Gln  
450 455 460

Asp Val Gly Leu Ser Ala Arg Val Gly Ala Ser Asn Leu Pro Ala Gly  
465 470 475 480

Ile Ser Leu Pro Ala Ser Ala Asn Leu Leu Leu Ser Thr Asp Ser Thr  
485 490 495

Arg Leu Ser Arg Glu Glu Gly Thr Ser Leu Ser Leu Glu Asn Leu Ser  
500 505 510

Leu Asn Pro Tyr Glu Gly Leu Leu Leu Gln Phe Pro Phe Val Ala

515

520

525

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1).. (22)

&lt;400&gt; 9

cgaagtggac atgaaagatg tg

22

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(22)

<400> 10

aaactaggcc cttcaccttc ag

22

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(24)

<400> 11

actgctgctg cttctctggc tcgg

24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(24)

<400> 12

gtggatgggt tccaggttcg ggac

24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(24)

<400> 13

tgctgaggga tgagtcacgc ttcc

24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(24)

<400> 14

gcaggaggc agccttggct ggca

24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1).. (24)

<400> 15

cttgcctgag acaaactcca gctg

24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1).. (24)

<400> 16

actgtcaaaa tcttccttgg agcc

24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(24)

<400> 17

tctctgggct ctaactcatt cagc

24

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(23)

<400> 18

tgcctgctgct cacggccgtg aac

23

<210> 19



<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(17)

<400> 19

tggcggccctt cagcctg

17

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(25)

<400> 20

atctagattg gacacatcac ccttc

25

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(22)

<400> 21

gtggatgaagt aggccagggt gg

22

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(21)

<400> 22

gtgggggtccc gggaaggcca c

21

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(22)

<400> 23

cttgttttttc caccagaccc cg

22

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(22)

<400> 24

tgagggatga gattcgtacc ag

22

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(23)

<400> 25

cctgggagga atcaccacc ttg

23

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 1524

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1524)

&lt;400&gt; 26

aug gcg ggu gcg ggc ccg aag cgg cgc gcg cua gcg gcg ccg gcg gcc 48

Met Ala Gly Ala Gly Pro Lys Arg Arg Ala Leu Ala Ala Pro Ala Ala

1 5 10 15

gag gag aag gaa gag gcg cgg gag aag aug cug gcc gcc aag agc gcg 96

Glu Glu Lys Glu Glu Ala Arg Glu Lys Met Leu Ala Ala Lys Ser Ala

20 25 30

gac ggc ucg gcg ccg gca ggc gag ggc gag ggc gug acc cug cag cgg 144

Asp Gly Ser Ala Pro Ala Gly Glu Gly Glu Gly Val Thr Leu Gln Arg

35 40 45

aac auc acg cug cuc aac ggc gug gcc auc auc gug ggg acc auu auc 192

Asn Ile Thr Leu Leu Asn Gly Val Ala Ile Ile Val Gly Thr Ile Ile

50 55 60

ggc ucg ggc auc uuc gug acg ccc acg ggc gug cuc aag gag gca ggc 240

Gly Ser Gly Ile Phe Val Thr Pro Thr Gly Val Leu Lys Glu Ala Gly

65 70 75 80

ucg ccg ggg cug gcg cug gug gug ugg gcc gcg ugc ggc guc uuc ucc 288

Ser Pro Gly Leu Ala Leu Val Val Trp Ala Ala Cys Gly Val Phe Ser

85 90 95

auc gug ggc gcg cuc ugc uac gcg gag cuc ggc acc acc auc ucc aaa 336

Ile Val Gly Ala Leu Cys Tyr Ala Glu Leu Gly Thr Thr Ile Ser Lys

100 105 110

ucg ggc ggc gac uac gcc uac aug cug gag guc uac ggc ugc cug ccc 384

Ser Gly Gly Asp Tyr Ala Tyr Met Leu Glu Val Tyr Gly Ser Leu Pro

115 120 125

gcc uuc cuc aag cuc ugg auc gag cug cuc auc auc cgg ccu uca ugc 432

Ala Phe Leu Lys Leu Trp Ile Glu Leu Leu Ile Ile Arg Pro Ser Ser

130 135 140

cag uac auc gug gcc cug guc uuc gcc acc uac cug cuc aag ccg cuc 480

Gln Tyr Ile Val Ala Leu Val Phe Ala Thr Tyr Leu Leu Lys Pro Leu

145 150 155 160

uuc ccc acc ugc ccg gug ccc gag gag gca gcc aag cuc gug gcc ugc 528

Phe Pro Thr Cys Pro Val Pro Glu Glu Ala Ala Lys Leu Val Ala Cys

165 170 175

cuc ugc gug cug cug cuc acg gcc gug aac ugc uac agc gug aag gcc 576

Leu Cys Val Leu Leu Leu Thr Ala Val Asn Cys Tyr Ser Val Lys Ala

180	185	190	
gcc acc cgg guc cag gau gcc uuu gcc gcc gcc aag cuc cug gcc cug			624
Ala Thr Arg Val Gln Xaa Ala Phe Ala Ala Ala Lys Leu Leu Ala Leu			
195	200	205	
gcc cug auc auc cug cug ggc uuc guc cag auc ggg aag ggu gau gug			672
Ala Leu Ile Ile Leu Leu Gly Phe Val Gln Ile Gly Lys Gly Xaa Val			
210	215	220	
ucc aaU cua gau ccc aac uuc uca uuu gaa ggc acc aaa cug gau gug			720
Ser Asn Leu Xaa Pro Asn Phe Ser Phe Glu Gly Thr Lys Leu Xaa Val			
225	230	235	240
ggg aac auu gug cug gca uua uac agc ggc cuc uuu gcc uau gga gga			768
Gly Asn Ile Val Leu Ala Leu Tyr Ser Gly Leu Phe Ala Tyr Gly Gly			
245	250	255	
ugg aaU uac uug aaU uuc guc aca gag gaa aug auc aac ccc uac aga			816
Trp Asn Tyr Leu Asn Phe Val Thr Glu Glu Met Ile Asn Pro Tyr Arg			
260	265	270	
aac cug ccc cug gcc auc auc auc ucc cug ccc auc gug acg cug gug			864
Asn Leu Pro Leu Ala Ile Ile Ile Ser Leu Pro Ile Val Thr Leu Val			
275	280	285	
uac gug cug acc aac cug gcc uac uuc acc acc cug ucc acc gag cag			912
Tyr Val Leu Thr Asn Leu Ala Tyr Phe Thr Thr Leu Ser Thr Glu Gln			
290	295	300	

aug cug ucg ucc gag gcc gug gcc gug gac uuc ggg aac uau cac cug 960  
 Met Leu Ser Ser Glu Ala Val Ala Val Asp Phe Gly Asn Tyr His Leu  
 305 310 315 320

ggc guc aug ucc ugg auc auc ccc guc uuc gug ggc cug ucc ugc uuc 1008  
 Gly Val Met Ser Trp Ile Ile Pro Val Phe Val Gly Leu Ser Cys Phe  
 325 330 335

ggc ucc guc aaU ggg ucc cug uuc aca ucc ucc agg cuc uuc uuc gug 1056  
 Gly Ser Val Asn Gly Ser Leu Phe Thr Ser Ser Arg Leu Phe Phe Val  
 340 345 350

ggg ucc cgg gaa ggc cac cug ccc ucc auc cuc ucc aug auc cac cca 1104  
 Gly Ser Arg Glu Gly His Leu Pro Ser Ile Leu Ser Met Ile His Pro  
 355 360 365

cag cuc cuc acc ccc gug ccg ucc cuc gug uuc acg ugu gug aug acg 1152  
 Gln Leu Leu Thr Pro Val Pro Ser Leu Val Phe Thr Cys Val Met Thr  
 370 375 380

cug cuc uac gcc uuc ucc aag gac auc uuc ucc guc auc aac uuc uuc 1200  
 Leu Leu Tyr Ala Phe Ser Lys Asp Ile Phe Ser Val Ile Asn Phe Phe  
 385 390 395 400

agc uuc uuc aac ugg cuc ugc gug gcc cug gcc auc auc ggc aug auc 1248  
 Ser Phe Phe Asn Trp Leu Cys Val Ala Leu Ala Ile Ile Gly Met Ile  
 405 410 415



ugg cug cgc cac aga aag ccu gag cuu gag cgg ccc auc aag gug aac 1296  
 Trp Leu Arg His Arg Lys Pro Glu Leu Glu Arg Pro Ile Lys Val Asn

420

425

430

cug gcc cug ccu gug uuc uuc auc cug gcc ugc cuc uuc cug auc gcc 1344  
 Leu Ala Leu Pro Val Phe Phe Ile Leu Ala Cys Leu Phe Leu Ile Ala

435

440

445

guc ucc uuc ugg aag aca ccc gug gag ugu ggc auc ggc uuc acc auc 1392  
 Val Ser Phe Trp Lys Thr Pro Val Glu Cys Gly Ile Gly Phe Thr Ile

450

455

460

auc cuc agc ggg cug ccc guc uac uuc uuc ggg guc ugg ugg aaa aac 1440  
 Ile Leu Ser Gly Leu Pro Val Tyr Phe Phe Gly Val Trp Trp Lys Asn

465

470

475

480

aag ccc aag ugg cuc cuc cag ggc auc uuc ucc acg acc guc cug ugu 1488  
 Lys Pro Lys Trp Leu Leu Gln Gly Ile Phe Ser Thr Thr Val Leu Cys

485

490

495

cag aag cuc aug cag gug guc ccc cag gag aca uag  
 Gln Lys Leu Met Gln Val Val Pro Gln Glu Thr

1524

500

505

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 1590

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).. (1590)

&lt;400&gt; 27

aug agc cag gac acc gag gug gau aug aag gag gug gag cug aaU gag 48

Met Ser Gln Asp Thr Glu Val Xaa Met Lys Glu Val Glu Leu Asn Glu

1 5 10 15

uua gag ccc gag aag cag ccg aug aac gcg gcg ucu ggg gcg gcc aug 96

Leu Glu Pro Glu Lys Gln Pro Met Asn Ala Ala Ser Gly Ala Ala Met

20 25 30

ucc cug gcg gga gcc gag aag aaU ggu cug gug aag auc aag gug gcg 144

Ser Leu Ala Gly Ala Glu Lys Asn Gly Leu Val Lys Ile Lys Val Ala

35 40 45

gaa gac gag gcg gag gcg gca gcc gcg gcu aag uuc acg ggc cug ucc 192

Glu Asp Glu Ala Glu Ala Ala Ala Ala Lys Phe Thr Gly Leu Ser

50 55 60

aag gag gag cug cug aag gug gca ggc agc ccc ggc ugg gua cgc acc 240

Lys Glu Glu Leu Leu Lys Val Ala Gly Ser Pro Gly Trp Val Arg Thr

65 70 75 80

cgc ugg gca cug cug cug cuc uuc ugg cuc ggc ugg cuc ggc aug cuu 288

Arg Trp Ala Leu Leu Leu Leu Phe Trp Leu Gly Trp Leu Gly Met Leu

85 90 95

gcu ggu gcc gug guc aua auc gug cga gcg ccg cgu ugu cgc gag cua 336  
 Ala Gly Ala Val Val Ile Ile Val Arg Ala Pro Arg Cys Arg Glu Leu

100

105

110

ccg gcg cag aag ugg ugg cac acg ggc gcc cuc uac cgc auc ggc gac 384  
 Pro Ala Gln Lys Trp Trp His Thr Gly Ala Leu Tyr Arg Ile Gly Asp

115

120

125

cuu cag gcc uuc cag ggc cac ggc gcg ggc aac cug gcg ggu cug aag 432  
 Leu Gln Ala Phe Gln Gly His Gly Ala Gly Asn Leu Ala Gly Leu Lys

130

135

140

ggg cgu cuc gau uac cug agc ucu cug aag gug aag ggc cuu gug cug 480  
 Gly Arg Leu Xaa Tyr Leu Ser Ser Leu Lys Val Lys Gly Leu Val Leu  
 145 150 155 160

ggg cca auu cac aag aac cag aag gau gau guc gcu cag acu gac uug 528  
 Gly Pro Ile His Lys Asn Gln Lys Xaa Xaa Val Ala Gln Xaa Asp Leu

165

170

175

cug cag auc gac ccc aaU uuu ggc ucc aag gaa gau uuu gac agu cuc 576  
 Leu Gln Ile Asp Pro Asn Phe Gly Ser Lys Glu Xaa Phe Asp Ser Leu

180

185

190

uug caa ucg gcu aaa aaa aag agc auc cgu guc auu cug gac cuu acu 624  
 Leu Gln Ser Ala Lys Lys Lys Ser Ile Arg Val Ile Leu Asp Leu Xaa

195

200

205

ccc aac uac cgg ggu gag aac ucg ugg uuc ucc acu cag guu gac acu 672  
 Pro Asn Tyr Arg Gly Glu Asn Ser Trp Phe Ser Xaa Gln Val Asp Xaa

210

215

220

gug gcc acc aag gug aag gau gcu cug gag uuu ugg cug caa gcu ggc 720  
 Val Ala Thr Lys Val Lys Xaa Ala Leu Glu Phe Trp Leu Gln Ala Gly

225

230

235

240

gug gau ggg uuc cag guu cgg gac aua gag aaU cug aag gau gca ucc 768  
 Val Xaa Gly Phe Gln Val Arg Asp Ile Glu Asn Leu Lys Xaa Ala Ser

245

250

255

uca uuc uug gcu gag ugg caa aaU auc acc aag ggc uuc agu gaa gac 816  
 Ser Phe Leu Ala Glu Trp Gln Asn Ile Thr Lys Gly Phe Ser Glu Asp

260

265

270

agg cuc uug auu gcg ggg acu aac ucc ucc gac cuu cag cag auc cug 864  
 Arg Leu Leu Ile Ala Gly Xaa Asn Ser Ser Asp Leu Gln Gln Ile Leu

275

280

285

agc cua cuc gaa ucc aac aaa gac uug cug uug acu agc uca uac cug 912  
 Ser Leu Leu Glu Ser Asn Lys Asp Leu Leu Leu Xaa Ser Ser Tyr Leu

290

295

300

ucu gau ucu ggu ucu acu ggg gag cau aca aaa ucc cua guc aca cag 960  
 Ser Xaa Ser Gly Ser Xaa Gly Glu His Thr Lys Ser Leu Val Thr Gln

305

310

315

320

uau uug aaU gcc acu ggc aaU cgc ugg ugc agc ugg agu uug ucu cag 1008

Tyr Leu Asn Ala Xaa Gly Asn Arg Trp Cys Ser Trp Ser Leu Ser Gln

325

330

335

gca agg cuc cug acu ucc uuc uug ccg gcu caa cuu cuc cga cuc uac 1056

Ala Arg Leu Leu Xaa Ser Phe Leu Pro Ala Gln Leu Leu Arg Leu Tyr

340

345

350

cag cug aug cuc uuc acc cug cca ggg acc ccu guu uuc agc uac ggg 1104

Gln Leu Met Leu Phe Thr Leu Pro Gly Thr Pro Val Phe Ser Tyr Gly

355

360

365

gau gag auu ggc cug gau gca gcu gcc cuu ccu gga cag ccu aug gag 1152

Xaa Glu Ile Gly Leu Xaa Ala Ala Ala Leu Pro Gly Gln Pro Met Glu

370

375

380

gcu cca guc aug cug ugg gau gag ucc agc uuc ccu gac auc cca ggg 1200

Ala Pro Val Met Leu Trp Xaa Glu Ser Ser Phe Pro Asp Ile Pro Gly

385

390

395

400

gcu gua agu gcc aac aug acu gug aag ggc cag agu gaa gac ccu ggc 1248

Ala Val Ser Ala Asn Met Xaa Val Lys Gly Gln Ser Glu Asp Pro Gly

405

410

415

ucc cuc cuu ucc uug uuc cgg cgg cug agu gac cag cgg agu aag gag 1296

Ser Leu Leu Ser Leu Phe Arg Arg Leu Ser Asp Gln Arg Ser Lys Glu

420

425

430

cgc ucc cua cug cau ggg gac uuc cac gcg uuc ucc gcu ggg ccu gga 1344

Arg Ser Leu Leu His Gly Asp Phe His Ala Phe Ser Ala Gly Pro Gly

435

440

445

cuc uuc ucc uau auc cgc cac ugg gac cag aau gag cgu uuu cug gua 1392  
 Leu Phe Ser Tyr Ile Arg His Trp Asp Gln Asn Glu Arg Phe Leu Val

450

455

460

gug cuu aac uuu ggg gau gug ggc cuc ucg gcu gga cug cag gcc ucc 1440  
 Val Leu Asn Phe Gly Xaa Val Gly Leu Ser Ala Gly Leu Gln Ala Ser

465

470

475

480

gac cug ccu gcc agc gcc agc cuc cca gcc aag gcu gac cuc cug cuc 1488  
 Asp Leu Pro Ala Ser Ala Ser Leu Pro Ala Lys Ala Asp Leu Leu Leu

485

490

495

agc acc cag cca ggc cgu gag gag ggc ucc ccu cuu gag cug gaa cgc 1536  
 Ser Thr Gln Pro Gly Arg Glu Glu Gly Ser Pro Leu Glu Leu Glu Arg

500

505

510

cug aaa cug gag ccu cac gaa ggg cug cug cuc cgc uuc ccc uac gcg 1584  
 Leu Lys Leu Glu Pro His Glu Gly Leu Leu Leu Arg Phe Pro Tyr Ala

515

520

525

gcc uga

1590

Ala

530

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

national application No.

PCT/JP99/04789

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C12N5/10, C07K14/47, C07K16/18,  
A61K48/00, A61K31/70, A61K39/395, C12Q1/02, A01K67/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C12N5/10, C07K14/47, C07K16/18,  
A61K48/00, A61K31/70, A61K39/395, C12Q1/02, A01K67/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),  
Genbank/DDBJ/EMBL/Geneseq,  
JICST (JOIS)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Prasad, D. P. et al. "Human LAT1, a Subunit of System L Amino Acid Transporter: Molecular Cloning and Transport Function", Biochem. Biophys. Res. Commun. (February, 1999), Vol. 255, No. 2, pages 283-288	1-55
PX	Tsurudome, M. et al. "Cutting Edge: Primary Structure of the Light Chain of Fusion Regulatory Protein-1/CD98/4F2 Predicts a Protein with Multiple Transmembrane Domains That Is Almost Identical to the Amino Acid Transporter E16", J. Immunol. (March, 1999), Vol. 162, No. 5, Pages 2462-2466	1-55
PX	Mastroberardino, L. et al. "Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family" Nature (September, 1999), Vol. 395, No. 6699, pages 288-291	1-55
PX	Kanai, Y. et al. "Expression Cloning and Characterization of a Transporter for Large Neutral Amino Acids Activated by the Heavy Chain of 4F2 Antigen (CD98)", J. Biol. Chem. (11 September, 1998), Vol. 273, No. 37, pages 23629-23632	1-55

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
17 November, 1999 (17.11.99)

Date of mailing of the international search report  
30 November, 1999 (30.11.99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04789

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Nakamura, E. et al. "4F2(CD98) Heavy Chain is Associated Covalently with an Amino Acid Transporter and Controls Intracellular Trafficking and Membrane Topology of 4F2 Heterodimer" J. Biol. Chem. (February, 1999), Vol. 274, No. 5, pages 3009-3016	1-55
X	Haynes, F. B. et al. "Characterization of a Monoclonal Antibody(4F2) that Binds to Human Monocytes and a Subset of Activated Lymphocytes", J. Immunol. (1981), Vol. 128, No. 4, pages 1409-1414	1-6, 20-27, 32-40
X	Hemler, E. M. et al. "Characterization of the Antigen Recognized by the Monoclonal Antibody(4F2): Different Molecular Forms on Human T and B Lymphoblastoid Cell Lines", J. Immunol. (1982), Vol. 129, No. 2, pages 623-628	1-6, 20-27, 32-40
A	Teixeira, S. et al. "Primary Structure of Human 4F2 Antigen Heavy Chain Predicts a Transmembrane Protein with a Cytoplasmic NH2 Terminus", J. Biol. Chem. (1987), Vol. 262, No. 20, pages 9574-9580	1-55
A	Lumadue, J. A. et al. "Cloning, sequence analysis, and expression of the large subunit of the human lymphocyte activation antigen 4F2", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987), Vol. 84, No. 24, pages 9204-9208	1-55
A	Quackenbush, E. et al. "Molecular Cloning of complementary DNAs Encoding the Heavy Chain of the Human 4F2 Cell-Surface Antigen: A Type II Membrane Glycoprotein Involved in Normal and Neoplastic Cell Growth", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987), Vol. 84, No. 18, pages 6526-6530	1-55
A	Broer, S. et al. "The 4F2hc surface antigen is necessary for expression of system L-like neutral amino acid-transport activity in C6-BU-1 rat glioma cells: evidence from expression studies in Xenopus laevis oocytes", Biochem. J. (1995), Vol. 312, No. 3, pages 863-870	1-55
A	Yao, S. Y. M. et al. "Cloning and Functional Expression of a cDNA from Rat Jejunal Epithelium Encoding a Protein(4F2hc) with System y+L Amino Acid Transport Activity", Biochem. J. (March, 1998), Vol. 330, No. 2, pages 745-752	1-55
A	Gaugitsch, H. W. et al. "A Novel Expressed, Integral Membrane Protein Linked to Cell Activation", J. Biol. Chem. (1992), Vol. 267, No. 16, pages 11267-11273	1-55



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C12N15/12, C12N5/10, C07K14/47, C07K16/18,  
A61K48/00, A61K31/70, A61K39/395, C12Q1/02, A01K67/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C12N15/12, C12N5/10, C07K14/47, C07K16/18,  
A61K48/00, A61K31/70, A61K39/395, C12Q1/02, A01K67/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),  
Genbank/DDBJ/EMBL/Geneseq, JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Prasad, D. P. et al. "Human LAT1, a Subunit of System L Amino Acid Transporter: Molecular Cloning and Transport Function" Biochem. Biophys. Res. Commun. (1999, Feb.) 第255巻 第2号 p. 283-288	1-55
PX	Tsurudome, M. et al. "Cutting Edge: Primary Structure of the Light Chain of Fusion Regulatory Protein-1/CD98/4F2 Predicts a Protein with Multiple Transmembrane Domains That Is Almost Identical to the Amino Acid Transporter E16" J. Immunol. (1999, Mar.) 第162巻 第5号 p. 2462-2466	1-55

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 11. 99

国際調査報告の発送日

30.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

## C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Mastroberardino, L. et al. "Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family" Nature (1998, Sep. 17) 第395巻 第6699号 p. 288-291	1-55
PX	Kanai, Y. et al. "Expression Cloning and Characterization of a Transporter for Large Neutral Amino Acids Activated by the Heavy Chain of 4F2 Antigen (CD98)" J. Biol. Chem. (1998, Sep. 11) 第273巻 第37号 p. 23629-23632	1-55
PX	Nakamura, E. et al. "4F2 (CD98) Heavy Chain is Associated Covalently with an Amino Acid Transporter and Controls Intracellular Trafficking and Membrane Topology of 4F2 Heterodimer" J. Biol. Chem. (1999, Feb) 第274巻 第5号 p. 3009-3016	1-55
X	Haynes, F. B. et al. "Characterization of a Monoclonal Antibody (4F2) that Binds to Human Monocytes and a Subset of Activated Lymphocytes" J. Immunol. (1981) 第128巻 第4号 p. 1409-1414	1-6, 20-27, 32-40
X	Hemler, E. M. et al. "Characterization of the Antigen Recognized by the Monoclonal Antibody (4F2): Different Molecular Forms on Human T and B Lymphoblastoid Cell Lines" J. Immunol. (1982) 第129巻 第2号 p. 623-628	1-6, 20-27, 32-40
A	Teixeira, S. et al. "Primary Structure of Human 4F2 Antigen Heavy Chain Predicts a Transmembrane Protein with a Cytoplasmic NH2 Terminus" J. Biol. Chem. (1987) 第262巻 第20号 p. 9574-9580	1-55
A	Lumadue, J. A. et al. "Cloning, sequence analysis, and expression of the large subunit of the human lymphocyte activation antigen 4F2" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 第84巻 第24号 p. 9204-9208	1-55
A	Quackenbush, E. et al. "Molecular Cloning of complementary DNAs Encoding the Heavy Chain of the Human 4F2 Cell-Surface Antigen: A Type II Membrane Glycoprotein Involved in Normal and Neoplastic Cell Growth" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 第84巻 第18号 p. 6526-6530	1-55
A	Broer, S. et al. "The 4F2hc surface antigen is necessary for expression of system L-like neutral amino acid-transport activity in C6-BU-1 rat glioma cells: evidence from expression studies in Xenopus laevis oocytes" Biochem. J. (1995) 第312巻 第3号 p. 863-870	1-55
A	Yao, S. Y. M. et al. "Cloning and Functional Expression of a cDNA from Rat Jejunal Epithelium Encoding a Protein (4F2hc) with System y+L Amino Acid Transport Activity" Biochem. J. (1998, Mar.) 第330巻 第2号 p. 745-752	1-55
A	Gaugitsch, H. W. et al. "A Novel Expressed, Integral Membrane Protein Linked to Cell Activation" J. Biol. Chem. (1992) 第267巻 第16号 p. 11267-11273	1-55

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04789

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>6</sup> C12N15/12, C12N5/10, C07K14/47, C07K16/18,  
A61K48/00, A61K31/70, A61K39/395, C12Q1/02, A01N67/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>6</sup> C12N15/12, C12N5/10, C07K14/47, C07K16/18,  
A61K48/00, A61K31/70, A61K39/395, C12Q1/02, A01N67/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),  
Genbank/DDBJ/EMBL/Geneseq,  
JICST (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Prasad, D. P. et al. "Human LAT1, a Subunit of System L Amino Acid Transporter: Molecular Cloning and Transport Function", Biochem. Biophys. Res. Commun. (February, 1999), Vol. 255, No. 2, pages 283-288	1-55
PX	Tsurudome, M. et al. "Cutting Edge: Primary Structure of the Light Chain of Fusion Regulatory Protein-1/CD98/4F2 Predicts a Protein with Multiple Transmembrane Domains That Is Almost Identical to the Amino Acid Transporter E16", J. Immunol. (March, 1999), Vol. 162, No. 5, Pages 2462-2466	1-55
PX	Mastroberardino, L. et al. "Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family" Nature (September, 1999), Vol. 395, No. 6699, pages 288-291	1-55
PX	Kanai, Y. et al. "Expression Cloning and Characterization of a Transporter for Large Neutral Amino Acids Activated by the Heavy Chain of 4F2 Antigen (CD98)", J. Biol. Chem. (11 September, 1998), Vol. 273, No. 37, pages 23629-23632	1-55



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

- later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
17 November, 1999 (17.11.99)

Date of mailing of the international search report  
30 November, 1999 (30.11.99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04789

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Nakamura, E. et al. "4F2(CD98) Heavy Chain is Associated Covalently with an Amino Acid Transporter and Controls Intracellular Trafficking and Membrane Topology of 4F2 Heterodimer" J. Biol. Chem. (February, 1999), Vol. 274, No. 5, pages 3009-3016	1-55
X	Haynes, F. B. et al. "Characterization of a Monoclonal Antibody(4F2) that Binds to Human Monocytes and a Subset of Activated Lymphocytes", J. Immunol. (1981), Vol. 128, No. 4, pages 1409-1414	1-6, 20-27, 32-40
X	Hemler, E. M. et al. "Characterization of the Antigen Recognized by the Monoclonal Antibody(4F2): Different Molecular Forms on Human T and B Lymphoblastoid Cell Lines", J. Immunol. (1982), Vol. 129, No. 2, pages 623-628	1-6, 20-27, 32-40
A	Teixeira, S. et al. "Primary Structure of Human 4F2 Antigen Heavy Chain Predicts a Transmembrane Protein with a Cytoplasmic NH2 Terminus", J. Biol. Chem. (1987), Vol. 262, No. 20, pages 9574-9580	1-55
A	Lumadue, J. A. et al. "Cloning, sequence analysis, and expression of the large subunit of the human lymphocyte activation antigen 4F2", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987), Vol. 84, No. 24, pages 9204-9208	1-55
A	Quackenbush, E. et al. "Molecular Cloning of complementary DNAs Encoding the Heavy Chain of the Human 4F2 Cell-Surface Antigen: A Type II Membrane Glycoprotein Involved in Normal and Neoplastic Cell Growth", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987), Vol. 84, No. 18, pages 6526-6530	1-55
A	Broer, S. et al. "The 4F2hc surface antigen is necessary for expression of system L-like neutral amino acid-transport activity in C6-BU-1 rat glioma cells: evidence from expression studies in Xenopus laevis oocytes", Biochem. J. (1995), Vol. 312, No. 3, pages 863-870	1-55
A	Yao, S. Y. M. et al. "Cloning and Functional Expression of a cDNA from Rat Jejunal Epithelium Encoding a Protein(4F2hc) with System y+L Amino Acid Transport Activity", Biochem. J. (March, 1998), Vol. 330, No. 2, pages 745-752	1-55
A	Gaugitsch, H. W. et al. "A Novel Expressed, Integral Membrane Protein Linked to Cell Activation", J. Biol. Chem. (1992), Vol. 267, No. 16, pages 11267-11273	1-55

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C12N5/10, C07K14/47, C07K16/18,  
A61K48/00, A61K31/70, A61K39/395, C12Q1/02, A01N67/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C12N5/10, C07K14/47, C07K16/18,  
A61K48/00, A61K31/70, A61K39/395, C12Q1/02, A01N67/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),  
Genbank/DBJ/EMBL/Geneseq, JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Prasad, D. P. et al. "Human LAT1, a Subunit of System L Amino Acid Transporter: Molecular Cloning and Transport Function" Biochem. Biophys. Res. Commun. (1999, Feb.) 第255巻 第2号 p. 283-288	1-55
PX	Tsurudome, M. et al. "Cutting Edge: Primary Structure of the Light Chain of Fusion Regulatory Protein-1/CD98/4F2 Predicts a Protein with Multiple Transmembrane Domains That Is Almost Identical to the Amino Acid Transporter E16" J. Immunol. (1999, Mar.) 第162巻 第5号 p. 2462-2466	1-55

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.11.99

国際調査報告の発送日

30.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4 N 9 5 4 9

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Mastroberardino, L. et al. "Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family" Nature (1998, Sep. 17) 第395巻 第6699号 p. 288-291	1-55
PX	Kanai, Y. et al. "Expression Cloning and Characterization of a Transporter for Large Neutral Amino Acids Activated by the Heavy Chain of 4F2 Antigen (CD98)" J. Biol. Chem. (1998, Sep. 11) 第273巻 第37号 p. 23629-23632	1-55
PX	Nakamura, E. et al. "4F2 (CD98) Heavy Chain is Associated Covalently with an Amino Acid Transporter and Controls Intracellular Trafficking and Membrane Topology of 4F2 Heterodimer" J. Biol. Chem. (1999, Feb) 第274巻 第5号 p. 3009-3016	1-55
X	Haynes, F. B. et al. "Characterization of a Monoclonal Antibody (4F2) that Binds to Human Monocytes and a Subset of Activated Lymphocytes" J. Immunol. (1981) 第128巻 第4号 p. 1409-1414	1-6, 20-27, 32-40
X	Hemler, E. M. et al. "Characterization of the Antigen Recognized by the Monoclonal Antibody (4F2): Different Molecular Forms on Human T and B Lymphoblastoid Cell Lines" J. Immunol. (1982) 第129巻 第2号 p. 623-628	1-6, 20-27, 32-40
A	Teixeira, S. et al. "Primary Structure of Human 4F2 Antigen Heavy Chain Predicts a Transmembrane Protein with a Cytoplasmic NH2 Terminus" J. Biol. Chem. (1987) 第262巻 第20号 p. 9574-9580	1-55
A	Lumadue, J. A. et al. "Cloning, sequence analysis, and expression of the large subunit of the human lymphocyte activation antigen 4F2" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 第84巻 第24号 p. 9204-9208	1-55
A	Quackenbush, E. et al. "Molecular Cloning of complementary DNAs Encoding the Heavy Chain of the Human 4F2 Cell-Surface Antigen: A Type II Membrane Glycoprotein Involved in Normal and Neoplastic Cell Growth" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 第84巻 第18号 p. 6526-6530	1-55
A	Broer, S. et al. "The 4F2hc surface antigen is necessary for expression of system L-like neutral amino acid-transport activity in C6-BU-1 rat glioma cells: evidence from expression studies in Xenopus laevis oocytes" Biochem. J. (1995) 第312巻 第3号 p. 863-870	1-55
A	Yao, S. Y. M. et al. "Cloning and Functional Expression of a cDNA from Rat Jejunal Epithelium Encoding a Protein (4F2hc) with System y <sup>+</sup> L Amino Acid Transport Activity" Biochem. J. (1998, Mar.) 第330巻 第2号 p. 745-752	1-55
A	Gaugitsch, H. W. et al. "A Novel Expressed, Integral Membrane Protein Linked to Cell Activation" J. Biol. Chem. (1992) 第267巻 第16号 p. 11267-11273	1-55

特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）



出願人代理人  
佐伯 憲生

殿

あて名

〒 103-0027  
東京都中央区日本橋3丁目15番地2号  
高愛ビル9階 たくみ特許事務所

PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨  
の決定の送付の通知書

(法施行規則第41条)  
[PCT規則44.1]

発送日  
(日.月.年)

201199

出願人又は代理人  
の書類記号

JA901121

今後の手続きについては、下記1及び4を参照。

国際出願番号

PCT/JP99/04789

国際出願日  
(日.月.年)

03.09.99

出願人（氏名又は名称）

科学技術振興事業団

1. ☒ 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出

出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる（PCT規則46参照）。

いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。

詳細については添付用紙の備考を参照すること。

どこへ 直接次の場所へ

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland  
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

詳細な手続きについては、添付用紙の備考を参照すること。

2. ☐ 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項（PCT17条(2)(a)）の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

3. ☐ 法施行規則第44条（PCT規則40.2）に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。

☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。

☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。

4. 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。

優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。

出願人が優先日から30月まで（官庁によってはもっと遅く）国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。

国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第二章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名

日本国特許庁（ISA/JP）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特許庁長官

4N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488





## 注 意

1. 国際調査報告の発送日から起算する条約第19条(1)及び規則46.1に従う国際事務局への補正期間に注意してください。
2. 条約22条(2)に規定する期間に注意してください。
3. 文献の写しの請求について

### 国際調査報告に記載した文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することもできますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

### 〔申込方法〕

- (1) 特許(実用新案・意匠)公報については、下記の点を明記してください。

- 特許・実用新案及び意匠の種類
- 出願公告又は出願公開の年次及び番号(又は特許番号、登録番号)
- 必要部数

- (2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

- 国際調査報告の写しを添付してください(返却します)。

### 〔申込み及び照会先〕

〒135 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ダイヤビル  
財団法人 日本特許情報機構 サービス課  
TEL 03-5690-3900

注意 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。



## 様式PCT/ISA/220の備考

この備考は、PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する基本的な指示を与えるためのものである。この備考は特許協力条約並びにこの条約に基づく規則及び実施細則の規定に基づいている。この備考とそれらの規定とが相違する場合には、後者が適用される。詳細な情報については、WIPOの出版物であるPCT出願人の手引も参照すること。

### PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する指示

出願人は、国際調査報告を受領した後、国際出願の請求の範囲を補正する機会が一回ある。しかし、国際出願のすべての部分（請求の範囲、明細書及び図面）が、国際予備審査の手續においても補正できるもので、例えば出願人が仮保護のために補正書を公開することを希望する場合又は国際公開前に請求の範囲を補正する別の理由がある場合を除き、通常PCT 19条の規定に基づく補正書を提出する必要はないことを強調しておく。さらに、仮保護は一部の国のみで与えられるだけであることも強調しておく。

#### 補正の対象となるもの

PCT 19条の規定により請求の範囲のみ補正することができる。

国際段階においてPCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手續において請求の範囲を（更に）補正することができる。

明細書及び図面は、PCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手續においてのみ補正することができる。

国内段階に移行する際、PCT 28条（又はPCT 41条）の規定により、国際出願のすべての部分を補正することができる。

#### いつ

国際調査報告の送付の日から2月又は優先日から16月の内どちらか遅く満了するほうの期間内。しかし、その期間の満了後であっても国際公開の技術的な準備の完了前に国際事務局が補正を受領した場合には、その補正書は、期間内に受理されたものとみなすことを強調しておく（PCT規則46.1）。

#### 補正書を提出すべきところ

補正書は、国際事務局のみに提出でき、受理官庁又は国際調査機関には提出してはいけない（PCT規則46.2）。国際予備審査の請求書を提出した／する場合については、以下を参照すること。

#### どのように

1以上の請求の範囲の削除、1以上の新たな請求の範囲の追加、又は1以上の請求の範囲の記載の補正による。

差替え用紙は、補正の結果、出願当初の用紙と相違する請求の範囲の各用紙毎に提出する。

差替え用紙に記載されているすべての請求の範囲には、アラビア数字を付さなければならない。請求の範囲を削除する場合、その他の請求の範囲の番号を付け直す必要はない。請求の範囲の番号を付け直す場合には、連続番号で付け直すなければならない（PCT実施細則第205号(b)）。

補正は国際公開の言語で行う。

#### 補正書にどのような書類を添付しなければならないか

##### 書簡（PCT実施細則第205号(b)）

補正書には書簡を添付しなければならない。

書簡は国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開されることはない。これを「PCT 19条(1)に規定する説明書」と混同してはならない（「PCT 19条(1)に規定する説明書」については、以下を参照）。

書簡は、英語又は仏語を選択しなければならない。ただし、国際出願の言語が英語の場合、書簡は英語で、仏語の場合、書簡は仏語で記載しなければならない。

書簡には、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違について表示しなければならない。特に、国際出願に記載した各請求の範囲との関連で次の表示（2以上の請求の範囲についての同一の表示する場合は、まとめることができる。）をしなければならない。

- (i) この請求の範囲は変更しない。
- (ii) この請求の範囲は削除する。
- (iii) この請求の範囲は追加である。
- (iv) この請求の範囲は出願時の1以上の請求の範囲と差し替える。
- (v) この請求の範囲は出願時の請求の範囲の分割の結果である。



次に、添付する書簡中での、補正についての説明の例を示す。

1. [請求の範囲の一部の補正によって請求の範囲の項数が48から51になった場合] :  
“請求の範囲1-29、31、32、34、35、37-48項は、同じ番号のもとに補正された請求の範囲と置き換えられた。請求の範囲30、33及び36項は変更なし。新たに請求の範囲49-51項が追加された。”
2. [請求の範囲の全部の補正によって請求の範囲の項数が15から11になった場合] :  
“請求の範囲1-15項は、補正された請求の範囲1-11項に置き換えられた。”
3. [原請求の範囲の項数が14で、補正が一部の請求の範囲の削除と新たな請求の範囲の追加を含む場合] :  
“請求の範囲1-6及び14項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。”又は  
“請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。その他の全ての請求の範囲は変更なし。”
4. [各種の補正がある場合] :  
“請求の範囲1-10項は変更なし。請求の範囲11-13、18及び19項は削除。請求の範囲14、15及び16項は補正された請求の範囲14項に置き換えられた。請求の範囲17項は補正された請求の範囲15、16及び17項に分割された。新たに請求の範囲20及び21項が追加された。”

“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”(PCT規則46.4)

補正書には、補正並びにその補正が明細書及び図面に与える影響についての説明書を提出することができる(明細書及び図面はPCT19条(1)の規定に基づいては補正できない)。

説明書は、国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開される。

説明書は、国際公開の言語で作成しなければならない。

説明書は、簡潔でなければならない、英語の場合又は英語に翻訳した場合に500語を越えてはならない。

説明書は、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違を示す書簡と混同してはならない。説明書を、その書簡に代えることはできない。説明書は別紙で提出しなければならない、見出しを付すものとし、その見出しは“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”の語句を用いることが望ましい。

説明書には、国際調査報告又は国際調査報告に列記された文献との関連性に関して、これらを誹謗する意見を記載してはならない。国際調査報告に列記された特定の請求の範囲に関連する文献についての言及は、当該請求の範囲の補正に関してのみ行うことができる。

国際予備審査の請求書が提出されている場合

PCT19条の規定に基づく補正書及び添付する説明書の提出の時に国際予備審査の請求書が既に提出されている場合には、出願人は、補正書(及び説明書)を国際事務局に提出すると同時にその写し及び必要な場合、その翻訳文を国際予備審査機関にも提出することが望ましい(PCT規則55.3(a)、62.2の第1文を参照)。詳細は国際予備審査請求書(PCT/IPEA/401)の注意書参照。

国内段階に移行するための国際出願の翻訳に関して

国内段階に移行する際、PCT19条の規定に基づいて補正された請求の範囲の翻訳を出願時の請求の範囲の翻訳の代わりに又は追加して、指定官庁/選択官庁に提出しなければならないこともあるので、出願人は注意されたい。

指定官庁/選択官庁の詳細な要求については、PCT出願人の手引きの第II巻を参照。



PCT

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]



出願人又は代理人 の書類記号 JA901121	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P99/04789	国際出願日 (日.月.年) 03.09.99	優先日 (日.月.年) 03.09.98
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。





## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>9</sup> C12N15/12, C12N5/10, C07K14/47, C07K16/18,  
A61K48/00, A61K31/70, A61K39/395, C12Q1/02, A01K67/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

訂正箇所

Int. Cl<sup>9</sup> C12N15/12, C12N5/10, C07K14/47, C07K16/18,  
A61K48/00, A61K31/70, A61K39/395, C12Q1/02, A01K67/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),  
Genbank/DDBJ/EMBL/Geneseq, JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Prasad, D. P. et al. "Human LAT1, a Subunit of System L Amino Acid Transporter: Molecular Cloning and Transport Function" Biochem. Biophys. Res. Commun. (1999, Feb.) 第255巻 第2号 p. 283-288	1-55
PX	Tsurudome, M. et al. "Cutting Edge: Primary Structure of the Light Chain of Fusion Regulatory Protein-1/CD98/4F2 Predicts a Protein with Multiple Transmembrane Domains That Is Almost Identical to the Amino Acid Transporter El6" J. Immunol. (1999, Mar.) 第162巻 第5号 p. 2462-2466	1-55

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 11. 99

国際調査報告の発送日

30.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Mastroberardino, L. et al. "Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family" Nature (1998, Sep. 17) 第395巻 第6699号 p. 288-291	1-55
PX	Kanai, Y. et al. "Expression Cloning and Characterization of a Transporter for Large Neutral Amino Acids Activated by the Heavy Chain of 4F2 Antigen (CD98)" J. Biol. Chem. (1998, Sep. 11) 第273巻 第37号 p. 23629-23632	1-55
PX	Nakamura, E. et al. "4F2 (CD98) Heavy Chain is Associated Covalently with an Amino Acid Transporter and Controls Intracellular Trafficking and Membrane Topology of 4F2 Heterodimer" J. Biol. Chem. (1999, Feb) 第274巻 第5号 p. 3009-3016	1-55
X	Haynes, F. B. et al. "Characterization of a Monoclonal Antibody (4F2) that Binds to Human Monocytes and a Subset of Activated Lymphocytes" J. Immunol. (1981) 第128巻 第4号 p. 1409-1414	1-6, 20-27, 32-40
X	Hemler, E. M. et al. "Characterization of the Antigen Recognized by the Monoclonal Antibody(4F2): Different Molecular Forms on Human T and B Lymphoblastoid Cell Lines" J. Immunol. (1982) 第129巻 第2号 p. 623-628	1-6, 20-27, 32-40
A	Teixeira, S. et al. "Primary Structure of Human 4F2 Antigen Heavy Chain Predicts a Transmembrane Protein with a Cytoplasmic NH2 Terminus" J. Biol. Chem. (1987) 第262巻 第20号 p. 9574-9580	1-55
A	Lumadue, J. A. et al. "Cloning, sequence analysis, and expression of the large subunit of the human lymphocyte activation antigen 4F2" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 第84巻 第24号 p. 9204-9208	1-55
A	Quackenbush, E. et al. "Molecular Cloning of complementary DNAs Encoding the Heavy Chain of the Human 4F2 Cell-Surface Antigen: A Type II Membrane Glycoprotein Involved in Normal and Neoplastic Cell Growth" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 第84巻 第18号 p. 6526-6530	1-55
A	Broer, S. et al. "The 4F2hc surface antigen is necessary for expression of system L-like neutral amino acid-transport activity in C6-BU-1 rat glioma cells: evidence from expression studies in Xenopus laevis oocytes" Biochem. J. (1995) 第312巻 第3号 p. 863-870	1-55
A	Yao, S. Y. M. et al. "Cloning and Functional Expression of a cDNA from Rat Jejunal Epithelium Encoding a Protein(4F2hc) with System y <sup>+</sup> L Amino Acid Transport Activity" Biochem. J. (1998, Mar.) 第330巻 第2号 p. 745-752	1-55
A	Gaugitsch, H. W. et al. "A Novel Expressed, Integral Membrane Protein Linked to Cell Activation" J. Biol. Chem. (1992) 第267巻 第16号 p. 11267-11273	1-55





# 手続補正書

(法第6条の規定による命令に基づく補正)

特許庁長官 殿

1. 国際出願の表示 PCT/JP99/04789

2. 出 願 人

名 称

科学技術振興事業団

Japan Science and Technology Corporation

あて名

〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町四丁目  
1番8号

1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama-Ken 332-0012

JAPAN

国 籍

日本国 J A P A N

住 所

日本国 J A P A N

3. 代 理 人

氏 名

(10266) 弁理士 佐 伯 憲 生

SAEKI Norio

あて名

〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋3丁目  
15番2号 高愛ビル 9階

9th Floor, Taka-ai Bldg., 15-2, Nihonbashi 3-chome,

Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

4. 補正命令の日付 14.09.99

5. 補正の対象 代理権を証明する書面

6. 補正の内容 別紙のとおり

7. 添付書類の目録 代理権を証明する書面 2通



## 委 任 状

1999年 9月 3日

私儀 弁理士 佐伯 憲生 氏 を代理人と定めて、下記の権限を委任します。

1. 特許協力条約に基づく国際出願

「中性アミノ酸トランスポーター及びその遺伝子」

に関する一切の件

2. 上記出願及び指定国の指定を取下げる件

3. 上記出願についての国際予備審査の請求に関する一切の件並びに請求及び選択国の選択を取下げる件



埼玉県川口市本町4丁目1番8号

科学技術振興事業団

理事長 中 村 守 孝







## 委任状

1999年 8月 26日

私儀

弁理士 (10266) 佐伯憲生氏

を以て代理人と定め、下記の権限を委任します。

## 1. 特許協力条約に基づく国際出願

「~~アミノ酸輸送蛋白及びその遺伝子~~」  
 に関する一切の件 中性アミノ酸トランスポーター及びその遺伝子

## 2. 上記出願及び指定国の指定を取り下げる件



## 3. 上記出願についての国際予備審査の請求に関する一切の件並びに請求及び選択国の選択を取り下げる件

あて名 神奈川県相模原市由野台 1-23-7

氏名 遠藤 仁



あて名 東京都八王子市緑町 214-102

氏名 金井 好克





# 特許協力条約

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

出願人代理人

佐伯 憲生

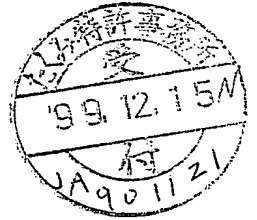
殿

あて名

〒103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9階 たくみ特許事務所

P C T



## 手続補正命令書

（法第6条、法施第30条）  
〔PCT3条（4）（i）14条（1）、規則26〕

PCT/JP99/04789

RO106

出願人又は代理人の書類記号 JA901121		発送日（日、月、年） 14.12.99
国際出願番号 PCT/JP99/04789		応答期間 発送日から 1箇月以内
出願人（氏名又は名称） 科学技術振興事業団		国際出願日（日、月、年） 03.09.99

出願人は、上記期間内に手続きの補正をしなければならない。補正すべき事項は、次の附属書に記載されている。

☒ 附属書A

☐ 附属書B

☐ 附属書C

（注意）

### 補正の方法

手続補正書に補正事項を補正した差替え用紙を添付することにより行う。また、手続補正書の「補正内容」の欄に差替えられる用紙と差替え用紙との相違について記載する。なお、補正によって書き換えられる用紙の明瞭さ及び直接複製の可能性に悪影響を及ぼすことなく手続補正書の「補正内容」の欄から記録原本への書き換えが容易にできる場合には差替え用紙を省略することができる。

（PCT規則26.4（a）、法施行規則様式第15備考4参照）

### 注意

補正がされないときは、国際出願は取り下げられたものとみなす旨の決定がされる。

（法第7条第1項、PCT規則26.5参照）

この手続補正命令書の写し及び附属書の写しは、国際事務局

☐ 及び国際調査機関

に、送付した。

名称及びあて名 日本国特許庁（RO/JP） 郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308 日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 様式PCT/RO/106（1998年7月）	権限のある職員 特許庁長官
---	------------------



図面は、特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律施行規則第30条第1項第3号に規定する要件に適合しない。

国際出願の図面について次の不備を発見した。

#### I. 図面の用紙に関して

- a. ☐ 用紙が直接複製することができない。
- b. ☐ 用紙に折り目、しわ、裂け目がある。
- c. ☐ 用紙の両面が用いられている。
- d. ☐ 用紙が可撓性のある／丈夫な／白色の／滑らかな／光沢のない／耐久性のあるものではない。
- e. ☐ 図面が別の用紙で作成されていない。
- f. ☐ 用紙が所定のとり方ではない。
- g. ☐ 用紙の大きさが日本工業規格A列4番の大きさではない。(横21cm、縦29.7cm)
- h. ☐ 用紙の余白が所定のとり方ではない。(最少：上端2.5cm、左端2.5cm、右端1.5cm、下端1cm)
- i. ☐ 用紙に記載されている出願人又は代理人の書類記号が用紙の上端の余白の左隅であって上端から1.5cm以内に記載されていない。
- j. ☐ 出願人又は代理人の書類記号が12字を超えている。
- k. ☐ 用紙の使用することができる面又は使用した面の周囲に枠が記載されている。
- l. ☐ 用紙にアラビア数字により連続した番号が付されていない。(例：1/3、2/3、3/3)
- m. ☐ 用紙の番号が用紙の上端又は下端の中央に付されていない。
- n. ☐ 用紙の番号が余白内に記載されている。(余白には記載できない。h参照)
- o. ☐ 用紙に訂正／重ね書き／行間挿入／削除箇所が多く行われている。
- p. ☐ 用紙に複写の際のよごれがある。

#### II. 図面に関して

- a. ☒ 図面が直接複製することができない。(図13の5.21.22は厚紙で描かれ、写像を妨げている)
- b. ☐ 不必要な記載事項がある。
- c. ☐ 図面の語句が翻訳された場合に、図面の線にかかるような記載がある。
- d. ☐ 耐久性のある、黒色の、十分に濃厚な濃墨等を用い、太さの均一な、かつ、明瞭な線で着色することなく作成されていない。
- e. ☐ 平行斜線によらない切断面がある。
- f. ☐ 縮尺による写真複製をしたときに容易に識別できない記載がある。
- g. ☐ 図式によらない尺度が記載されている。
- h. ☐ 簡潔かつ明瞭でない数字、文字、引出線がある。
- i. ☐ 製図用具を用いることなしに引かれた線がある。
- j. ☐ 図中の他の要素に対し妥当でない比率で記載した図がある。
- k. ☐ 0.32cm以下の大きさの数字又は文字がある。
- l. ☐ ローマ字及び慣習となっているギリシャ文字以外の文字の記載がある。
- m. ☐ 2以上の用紙に描かれた図であって単一の完全な図を得るように用紙を合わせたときに隠れる部分がある。
- n. ☒ 適切に配置されていない図がある。(図10)
- o. ☐ 個々の図に連続したアラビア数字による番号が付されていない。
- p. ☐ 用紙の番号と関係のある番号が付されている図がある。
- q. ☐ 明細書に用いていない引用符号が記載されている。
- r. ☐ 明細書に用いられている引用符号の記載がない。
- s. ☐ 異なった引用符号により表示された同一の部分がある。

(注意)





## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

**NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio  
Taka-ai Building  
9th floor  
15-2, Nihonbashi 3-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 103-0027  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 09 December 1999 (09.12.99)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference JA901121	
International application No. PCT/JP99/04789	International filing date (day/month/year) 03 September 1999 (03.09.99)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 03 September 1998 (03.09.98)
Applicant  JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
02 Sept 1999 (02.09.99)	11/248546	JP	22 Octo 1999 (22.10.99)

<p align="center"><b>The International Bureau of WIPO</b> 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p align="right">Taïeb Akreimi </p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	--





## INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

## CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

## REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

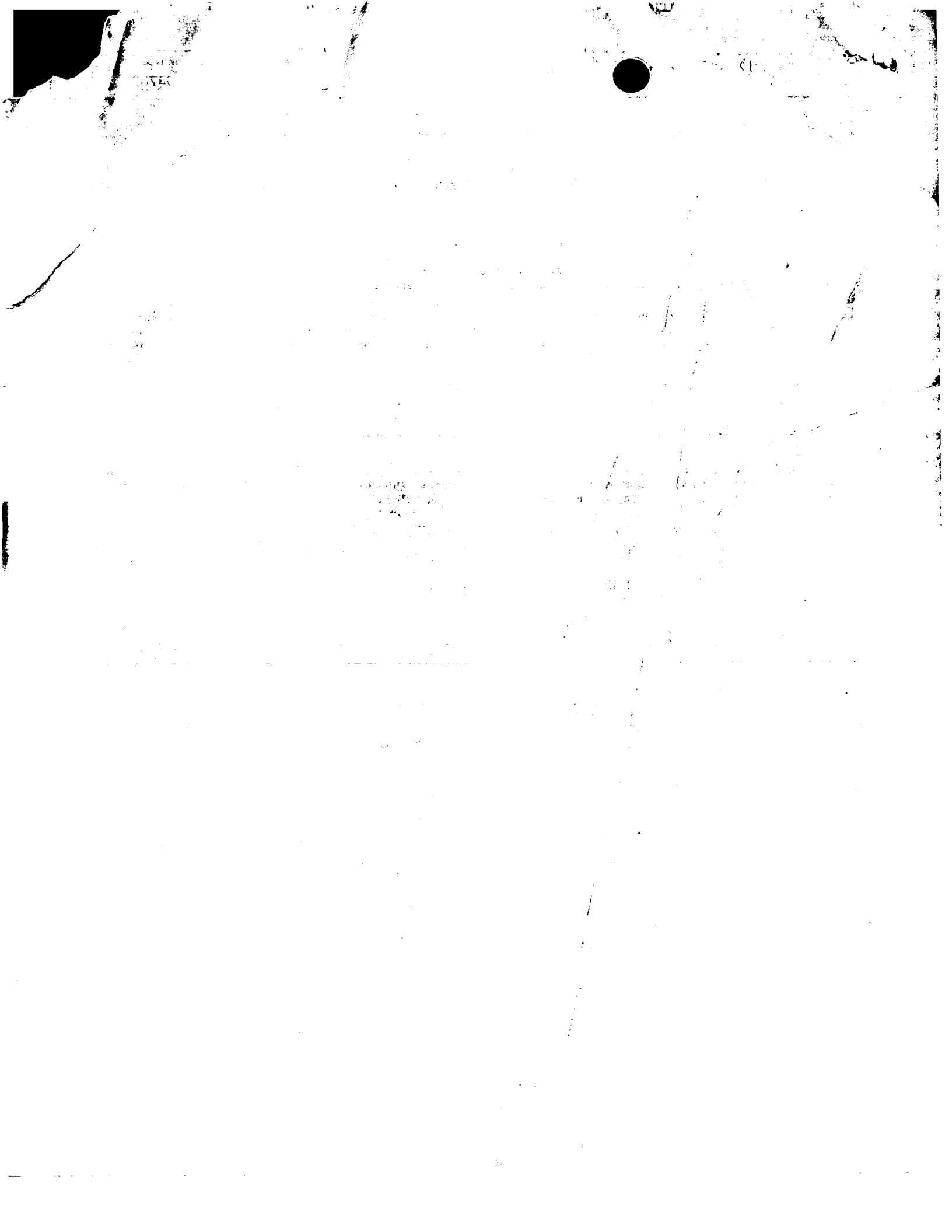
For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.





PATENT COOPERATION TR Y

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio  
Taka-ai Building  
9th floor  
15-2, Nihonbashi 3-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 103-0027  
JAPON

# NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

Date of mailing (day/month/year) 24 September 1999 (24.09.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference JA901121	International application No. PCT/JP99/04789

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION (for all designated States except US)  
ENDOU, Hitoshi et al (for US)

International filing date : 03 September 1999 (03.09.99)

Priority date(s) claimed : 03 September 1998 (03.09.98)  
02 September 1999 (02.09.99)

Date of receipt of the record copy  
by the International Bureau : 17 September 1999 (17.09.99)

List of designated Offices :

EP : AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE  
National : AU,CA,US

## ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
- ☒ confirmation of precautionary designations
- ☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

  
M. Sakai

Telephone No. (41-22) 338.83.38



# 特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

佐伯 憲生

殿

あて名

〒103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9階 たくみ特許事務所

PCT/JP99/04789

PE402

P C T



## 国際予備審査請求書の の受理通知書

（法施行規則第54条第1項）

〔PCT規則59.3(e)及び61.1(b)第1文、  
実施細則601(a)〕

発送日（日．月．年）

29.02.00

出願人又は代理人  
の書類記号

JA901121

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP99/04789

国際出願日（日．月．年）

03.09.99

優先日（日．月．年）

03.09.98

出願人（氏名又は名称）

科学技術振興事業団

1. 国際予備審査機関は、国際出願の国際予備審査請求書を次の日に受理したことを通知する。

17日02月00年

2. この受理の日は次に示す日である。

☒ 管轄する国際予備審査機関が国際予備審査請求書を受理した日  
（PCT規則61.1(b)）

☐ 管轄する国際予備審査機関に代わって国際予備審査請求書を受理した日  
（PCT規則59.3(e)）

☐ 国際予備審査請求書の手続き補完書を管轄する国際予備審査機関が受理した日

3. ☐ 受理の日は、優先日から19箇月が経過している。

（注意） 国際予備審査請求書に記載した選択国の国内段階開始時期の優先日から30箇月まで（遅い官庁がある）の効果はない。（PCT第39条（1））したがって、国内段階移行の手続きは、優先日から20箇月以内（遅い官庁がある）に行わなければならない。（PCT第22条）  
詳細については、PCT出願人の手引き・第II巻」を参照すること。

☐ この内容は、口頭又は電話により次の日に行った連絡を確認するためのものである。

4. 上記の3に該当する場合に、この通知書の写しは国際事務局に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

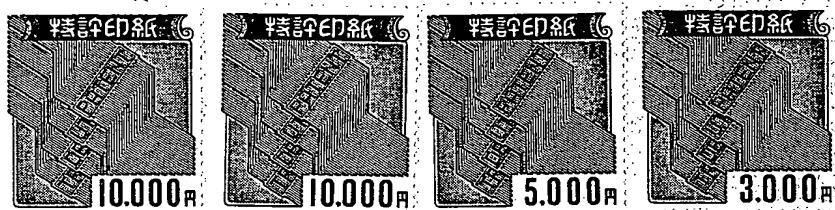
日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/IPEA/402（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官





予備審査請求手数料

28,000円





## ご利用明細

本日はご来店いただきありがとうございます。

年月日	時刻	取扱店番	銀行番号	支店番号	口座番号	印紙税申告納付につき廻町
120217	12:07	022	022	022	0632671	***
お取引内容	お取引金額	お取引回数	残高	お取扱金額		
お振込	¥16,500*			*** **		
ご案内				*** **		
お受取人 東京三菱銀行 内幸町支店						
普通 0473286						
WIPO-PCT GENEVA 様						
ご依頼人 タクミトツキヨウザシヨウ サエキ ノリオ 様						
0352052521						
税込手数料 10.5 円をご利用口座からいただきました						

郵送でお申し込みいただけます。

住所変更届&公共料金自動支払い  
総合口座 マイカード<ゴールド>  
メールDEローン



●残高欄の金額は決済未処理の証券類を含んでいます。

●残高の頭に「-」がある場合は、お借入れ残高を表わします。



東京三菱銀行



取扱手数料

16,500 円



## 手続補正書

(法第6条の規定による命令に基づく補正)

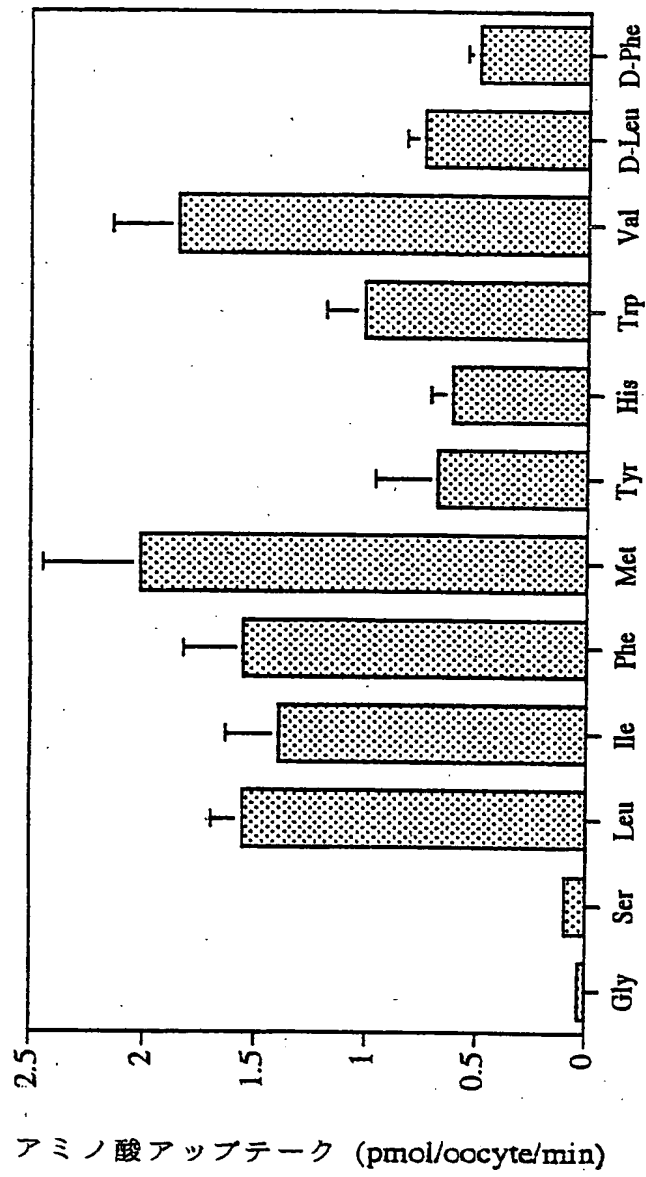
特許庁長官 殿



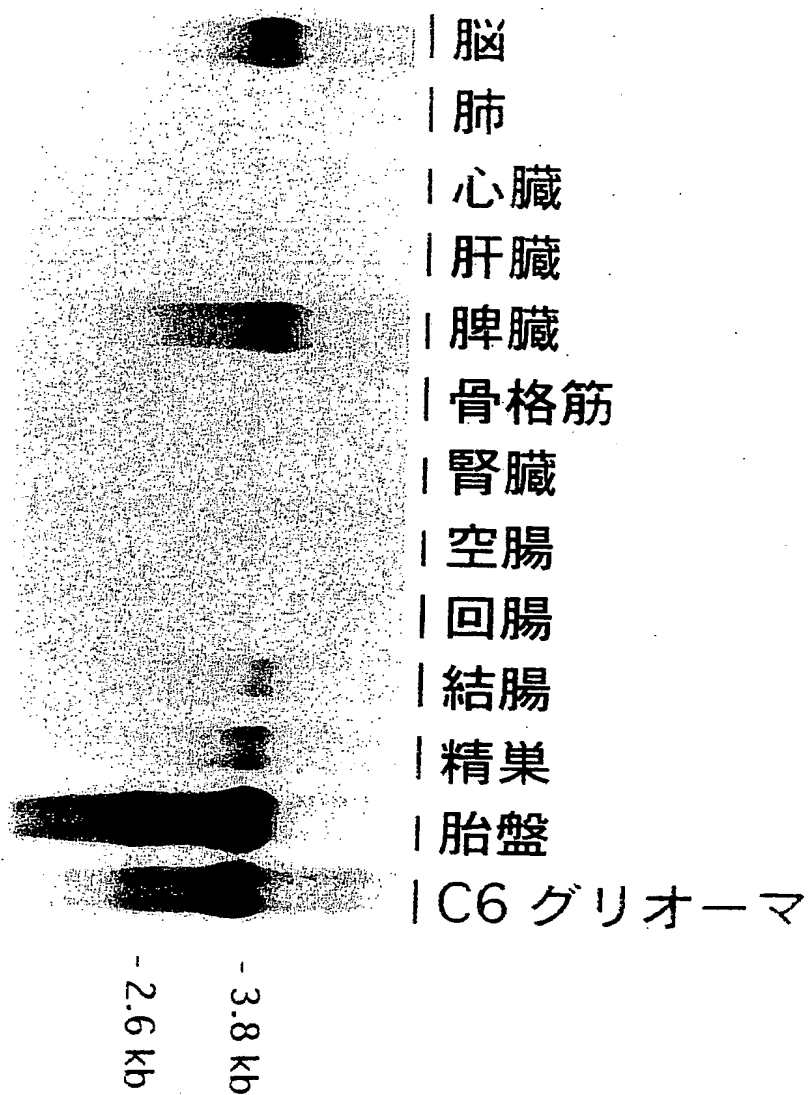
1. 国際出願の表示 PCT/J P 99 / 0 4 7 8 9
2. 出 願 人  
 名 称 科学技術振興事業団  
 Japan Science and Technology Corporation  
 あて名 〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町4丁目  
 1番8号  
 1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama-Ken 332-0012  
 JAPAN  
 国 籍 日本国 J A P A N  
 住 所 日本国 J A P A N
3. 代 理 人  
 氏 名 (10266) 弁理士 佐 伯 憲 生  
 SAEKI Norio  
 あて名 〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目  
 15番2号 高愛ビル 9階  
 9th Floor, Taka-ai Bldg., 15-2, Nihonbashi 3-chome,  
 Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN
4. 補正命令の日付 14. 12. 99
5. 補正の対象 図面第10図、第13図、第14図、第15図、  
 第21図、第22図
6. 補正の内容 別紙のとおり
7. 添付書類の目録
- |                  |     |
|------------------|-----|
| (1) 図面第10図の新たな用紙 | 1 部 |
| (2) 図面第13図の新たな用紙 | 3 部 |
| (3) 図面第14図の新たな用紙 | 3 部 |
| (4) 図面第15図の新たな用紙 | 3 部 |
| (5) 図面第21図の新たな用紙 | 3 部 |
| (6) 図面第22図の新たな用紙 | 3 部 |





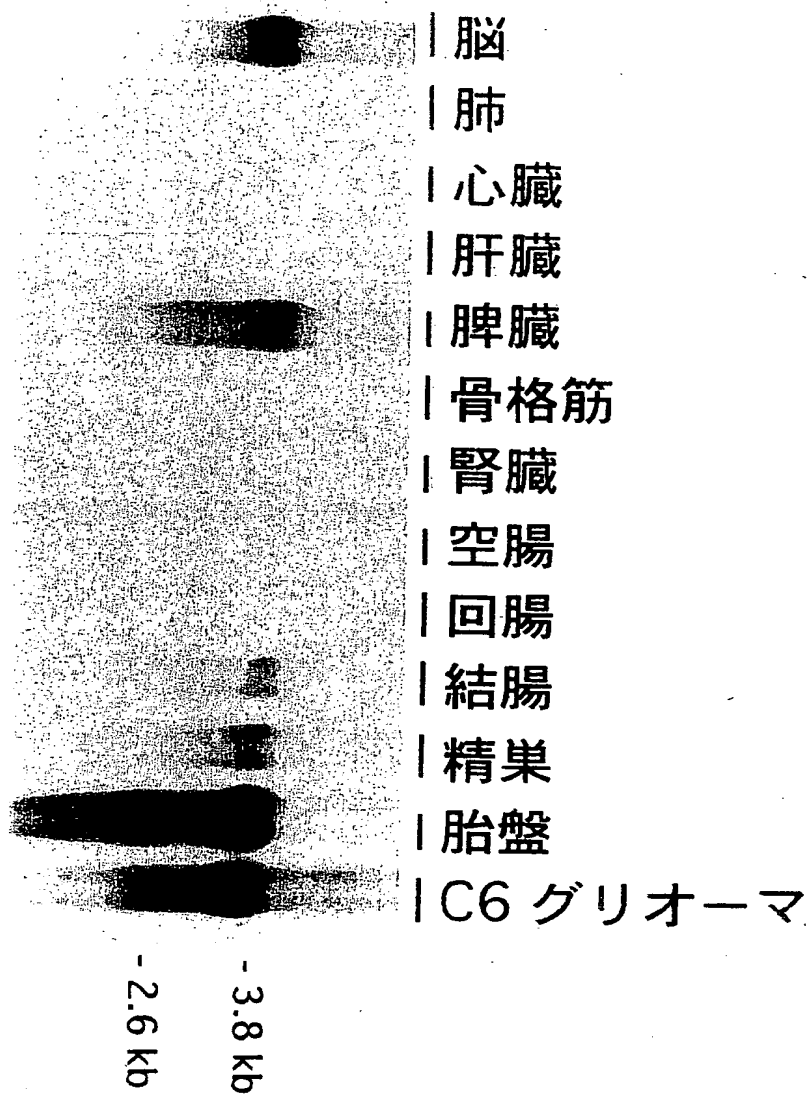




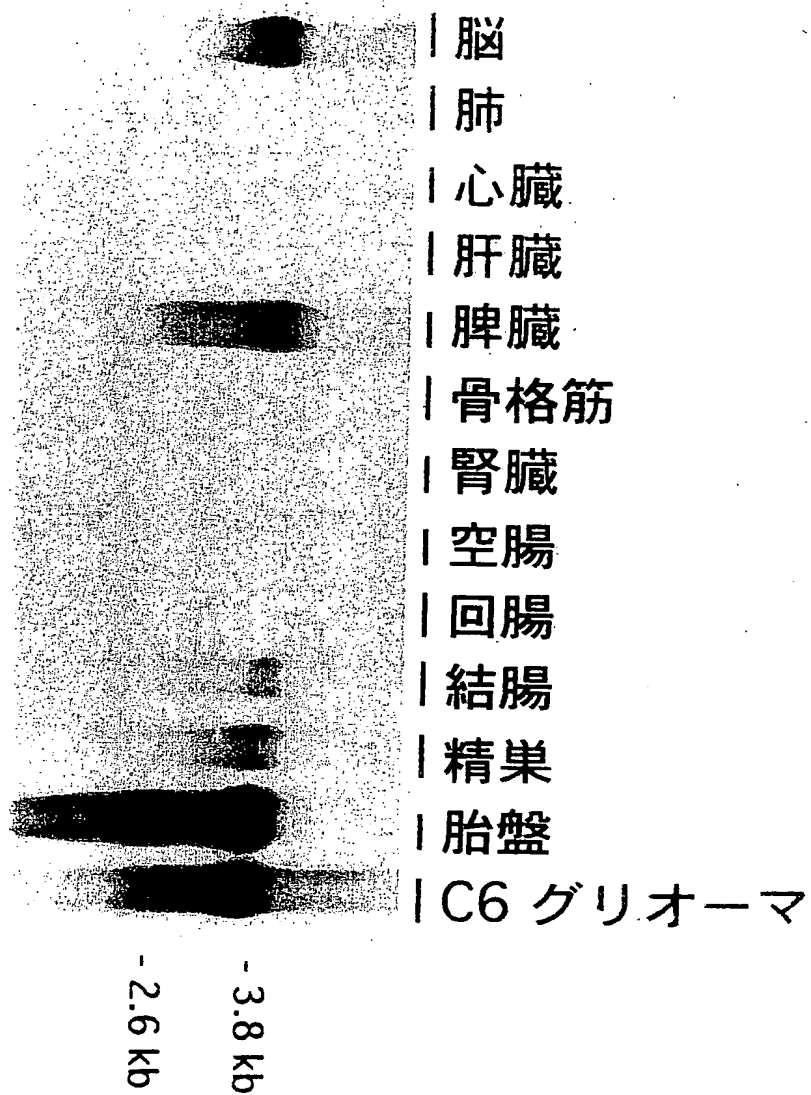




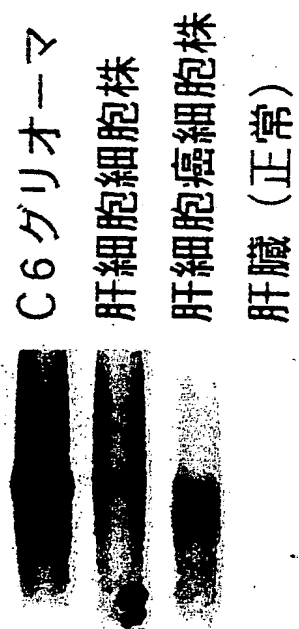






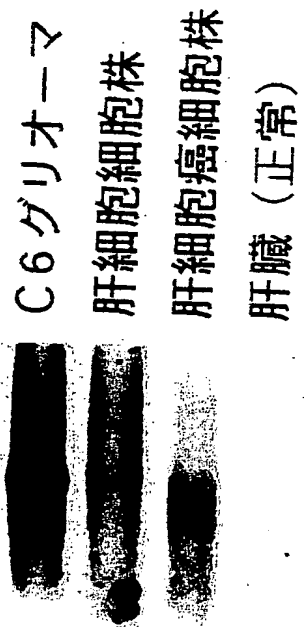






- 3.8 kb





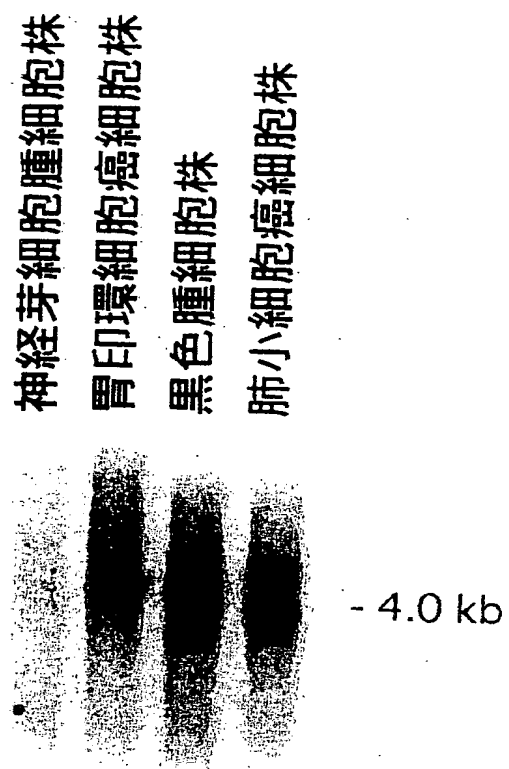




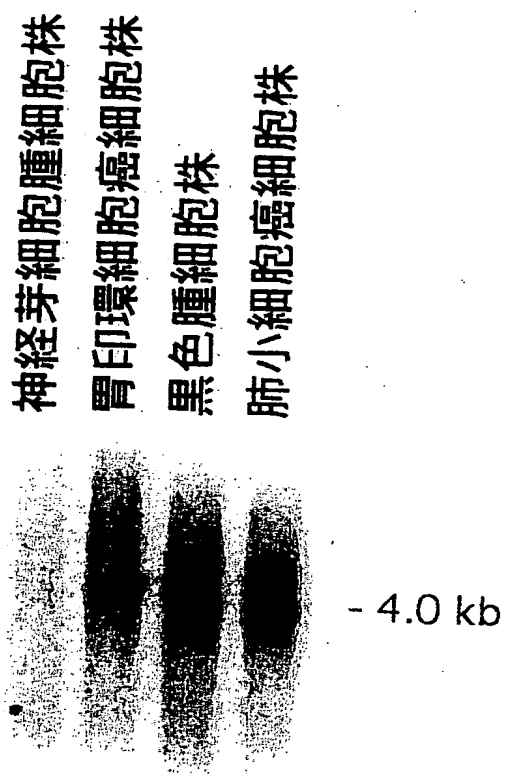
C6グリーオーマ  
肝細胞細胞株  
肝細胞癌細胞株  
肝臓 (正常)



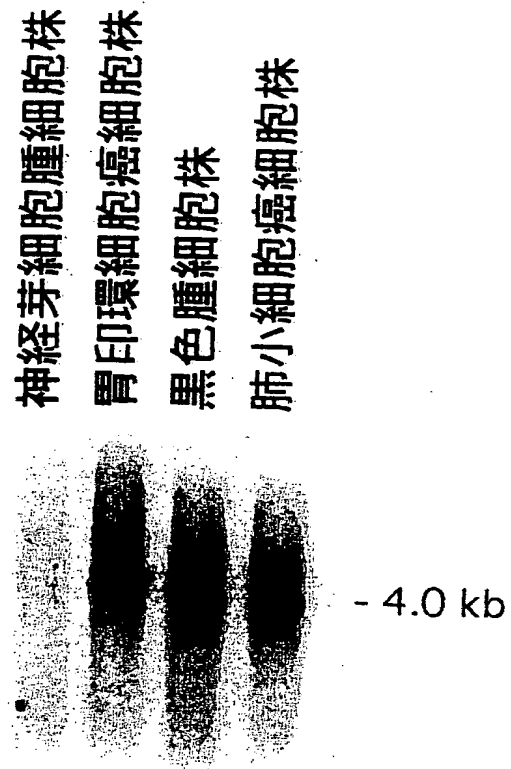






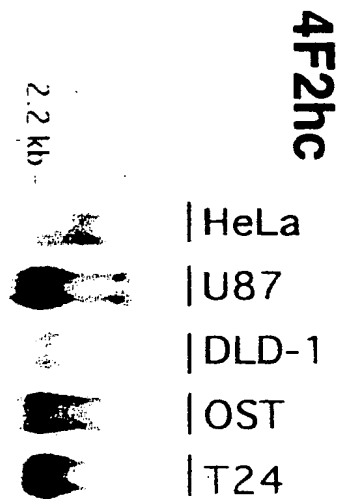
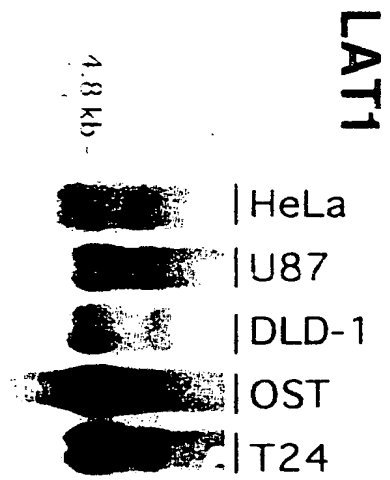




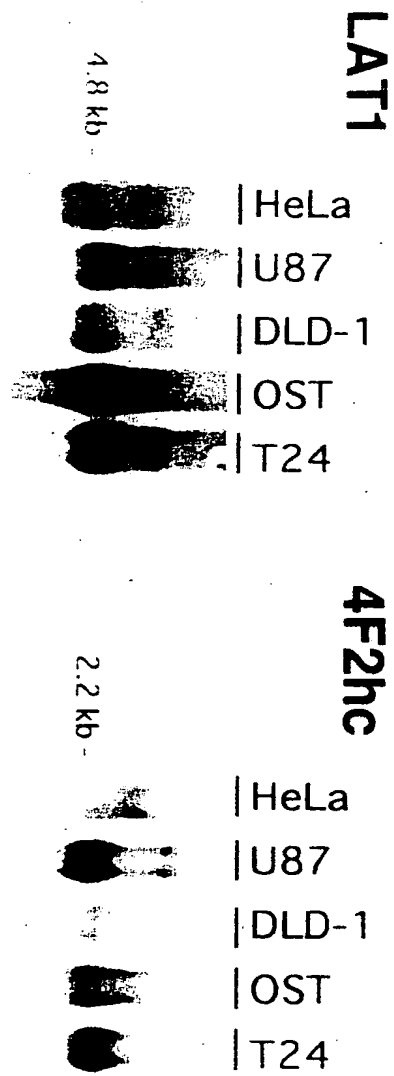




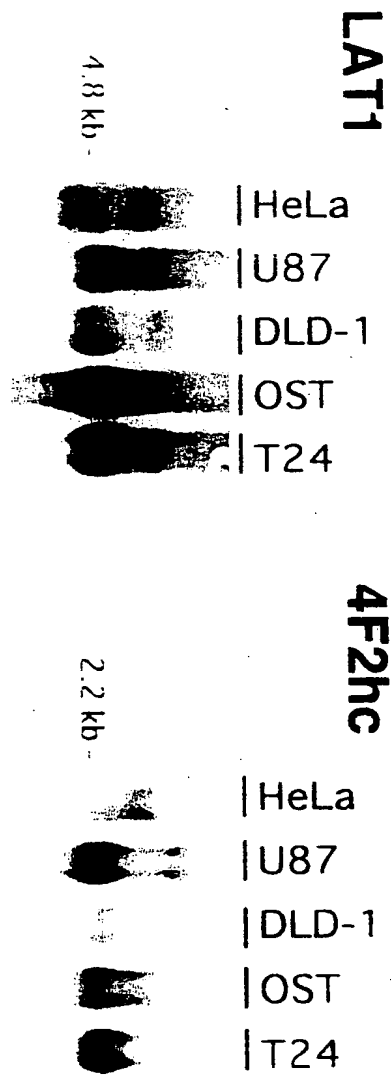






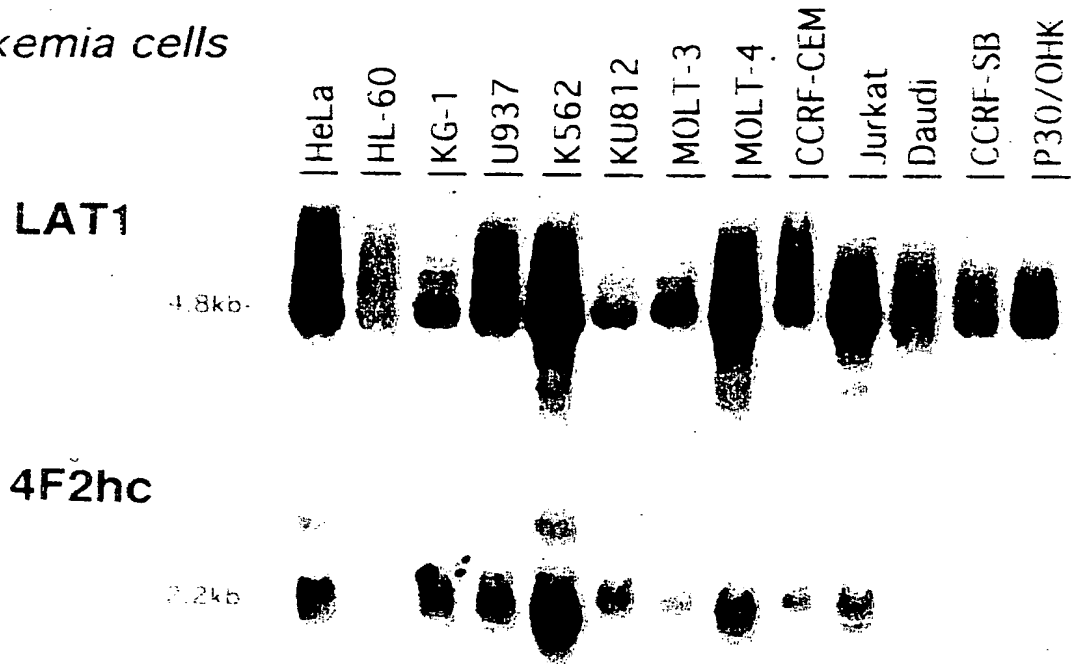








*Leukemia cells*







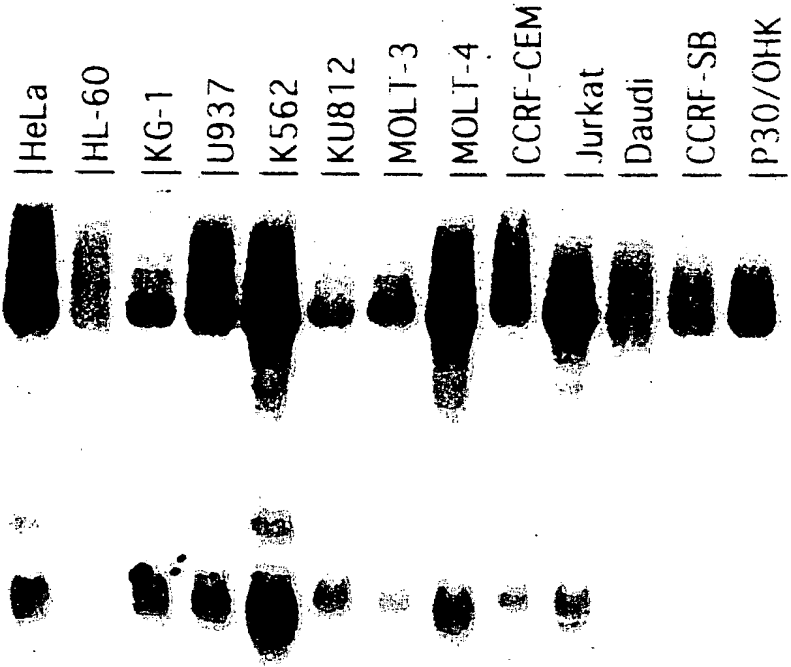
*Leukemia cells*

**LAT1**

4.8kb

**4F2hc**

2.2kb





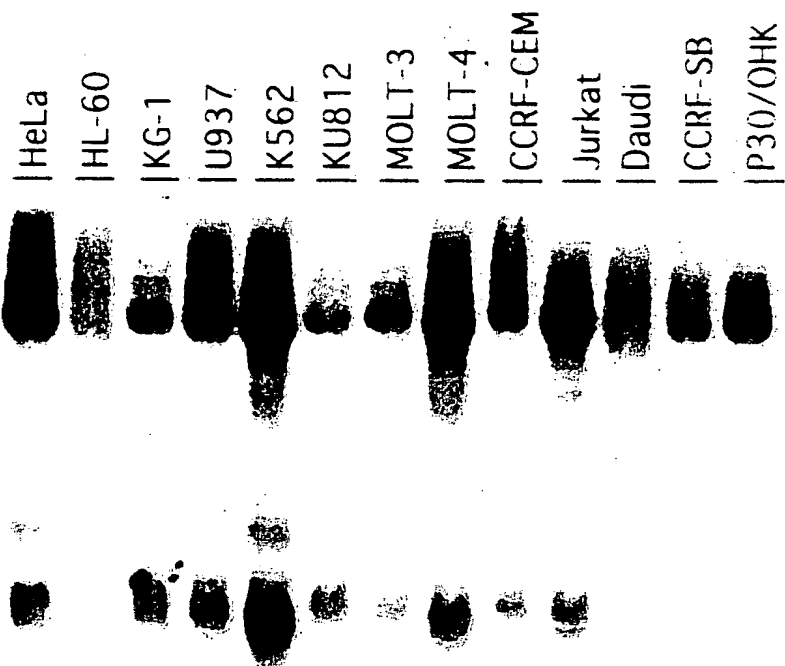
*Leukemia cells*

**LAT1**

4.8kb-

**4F2hc**

2.2kb-






特許協力条約に基づく出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号	
国際出願日	
(受付印)	
出願人又は代理人の書類記号 (希望する場合、最大12文字) JA901121	

第 I 欄 発明の名称

中性アミノ酸トランスポーター及びその遺伝子

第 II 欄 出願人

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

科学技術振興事業団

Japan Science and Technology Corporation

〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町4丁目1番8号  
1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama-ken  
332-0012 JAPAN

☐ この欄に記載した者は、  
発明者でもある。

電話番号:  
048-226-5619

ファクシミリ番号:  
048-226-5652

加入電話番号:

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☒ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

遠藤 仁 ENDOU Hitoshi

〒229-0022 日本国神奈川県相模原市由野台1-23-7  
1-23-7, Yoshinodai, Sagami-hara-shi, Kanagawa-ken  
229-0022 JAPAN

この欄に記載した者は  
次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続業に記載されている。

第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 共通の代表者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

10266 弁理士 佐伯 憲生 SAEKI Norio

〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号  
高愛ビル 9階

9th floor, Taka-ai Building, 15-2, Nihonbashi 3-chome,  
Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

電話番号:  
03-5205-2521

ファクシミリ番号:  
03-5205-2522

加入電話番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。



## 第 III 欄の続き その他の出人又は発明者

この続票を使用しないときは、この用紙を額巻に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

金井 好克 KANAI Yoshikatsu

〒193-0932 日本国東京都八王子市緑町 2 1 4 - 1 0 2

214-102, Midoricho, Hachioji-shi, Tokyo  
193-0932 JAPANこの欄に記載した者は、  
次に該当する:☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したとき  
は、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、  
次に該当する:☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したとき  
は、以下に記入しないこと)

国籍 (国名):

住所 (国名):

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、  
次に該当する:☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したとき  
は、以下に記入しないこと)

国籍 (国名):

住所 (国名):

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、  
次に該当する:☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したとき  
は、以下に記入しないこと)

国籍 (国名):

住所 (国名):

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国☐ その他の出願人又は発明者が他の続票に記載されている。





## 第Ⅴ欄 国の指定

規則 4.9(a)の規定に基づき次の指定を行う（該当する□にレ印を付すこと；少なくとも1つの□にレ印を付すこと）。

## 広域半島管

- ☐ AP ARIPO半島管：GH ガーナ Ghana, GM ガンビア Gambia, KE ケニア Kenya, LS レソト Lesotho, MW マラウイ Malawi, SD スーダン Sudan, SL シエラ・レオーネ Sierra Leone, SZ スワジランド Swaziland, UG ウガンダ Uganda, ZW ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締結国である他の国
- ☐ EA ユーラシア半島管：AM アルメニア Armenia, AZ アゼルバイジャン Azerbaijan, BY ベラルーシ Belarus, KG キルギス Kyrgyzstan, KZ カザフスタン Kazakhstan, MD モルドヴァ Republic of Moldova, RU ロシア Russian Federation, TJ タジキスタン Tajikistan, TM トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☒ EP ヨーロッパ半島管：AT オーストリア Austria, BE ベルギー Belgium, CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, CY キプロス Cyprus, DE ドイツ Germany, DK デンマーク Denmark, ES スペイン Spain, FI フィンランド Finland, FR フランス France, GB 英国 United Kingdom, GR ギリシャ Greece, IE アイルランド Ireland, IT イタリア Italy, LU ルクセンブルグ Luxembourg, MC モナコ Monaco, NL オランダ Netherlands, PT ポルトガル Portugal, SE スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☐ OA OAPI 半島管：BF ブルキナ・ファソ Burkina Faso, BJ ベナン Benin, CF 中央アフリカ Central African Republic, CG コンゴ Congo, CI コートジボアール Côte d'Ivoire, CM カメルーン Cameroon, GA ガボン Gabon, GN ギニア Guinea, GW ギニア・ビサウ Guinea-Bissau, ML マリ Mali, MR モーリタニア Mauritania, NE ニジェール Niger, SN セネガル Senegal, TD チャード Chad, TG トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国と特許協力条約の締結国である他の国（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する）

## 国内半島管（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する）

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> AE アラブ首長国連邦 United Arab Emirates                          | <input type="checkbox"/> LR リベリア Liberia  |
| <input type="checkbox"/> AL アルバニア Albania  | <input type="checkbox"/> LS レソト Lesotho   |
| <input type="checkbox"/> AM アルメニア Armenia  | <input type="checkbox"/> LT リトアニア Lithuania   |
| <input type="checkbox"/> AT オーストリア Austria   | <input type="checkbox"/> LU ルクセンブルグ Luxembourg  |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU オーストラリア Australia                           | <input type="checkbox"/> LV ラトヴィア Latvia  |
| <input type="checkbox"/> AZ アゼルバイジャン Azerbaijan                                    | <input type="checkbox"/> MD モルドヴァ Republic of Moldova                                   |
| <input type="checkbox"/> BA ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina                   | <input type="checkbox"/> MG マダガスカル Madagascar   |
|  | <input type="checkbox"/> MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> BB バルバドス Barbados   | <input type="checkbox"/> MN モンゴル Mongolia   |
| <input type="checkbox"/> BG ブルガリア Bulgaria   | <input type="checkbox"/> MW マラウイ Malawi   |
| <input type="checkbox"/> BR ブラジル Brazil  | <input type="checkbox"/> MX メキシコ Mexico   |
| <input type="checkbox"/> BY ベラルーシ Belarus  | <input type="checkbox"/> NO ノルウェー Norway  |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA カナダ Canada                                  | <input type="checkbox"/> NZ ニュー・ジーランド New Zealand                                       |
| <input type="checkbox"/> CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン<br>Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> PL ポーランド Poland  |
| <input type="checkbox"/> CN 中国 China   | <input type="checkbox"/> PT ポルトガル Portugal  |
| <input type="checkbox"/> CU キューバ Cuba  | <input type="checkbox"/> RO ルーマニア Romania   |
| <input type="checkbox"/> CZ チェッコ Czech Republic                                    | <input type="checkbox"/> RU ロシア Russian Federation                                      |
| <input type="checkbox"/> DE ドイツ Germany  | <input type="checkbox"/> SD スーダン Sudan  |
| <input type="checkbox"/> DK デンマーク Denmark  | <input type="checkbox"/> SE スウェーデン Sweden   |
| <input type="checkbox"/> EE エストニア Estonia  | <input type="checkbox"/> SG シンガポール Singapore  |
| <input type="checkbox"/> ES スペイン Spain   | <input type="checkbox"/> SI スロヴェニア Slovenia   |
| <input type="checkbox"/> FI フィンランド Finland   | <input type="checkbox"/> SK スロヴァキア Slovakia   |
| <input type="checkbox"/> GB 英国 United Kingdom                                      | <input type="checkbox"/> SL シエラ・レオーネ Sierra Leone                                       |
| <input type="checkbox"/> GD グレナダ Grenada   | <input type="checkbox"/> TJ タジキスタン Tajikistan   |
| <input type="checkbox"/> GE グルジア Georgia   | <input type="checkbox"/> TM トルクメニスタン Turkmenistan                                       |
| <input type="checkbox"/> GH ガーナ Ghana  | <input type="checkbox"/> TR トルコ Turkey  |
| <input type="checkbox"/> GM ガンビア Gambia  | <input type="checkbox"/> TT トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago                              |
| <input type="checkbox"/> HR クロアチア Croatia  | <input type="checkbox"/> UA ウクライナ Ukraine   |
| <input type="checkbox"/> HU ハンガリー Hungary  | <input type="checkbox"/> UG ウガンダ Uganda   |
| <input type="checkbox"/> ID インドネシア Indonesia                                       | <input checked="" type="checkbox"/> US 米国 United States of America                      |
| <input type="checkbox"/> IL イスラエル Israel   |   |
| <input type="checkbox"/> IN インド India  | <input type="checkbox"/> UZ ウズベキスタン Uzbekistan  |
| <input type="checkbox"/> IS アイスランド Iceland   | <input type="checkbox"/> VN ヴィエトナム Viet Nam   |
| <input type="checkbox"/> JP 日本 Japan   | <input type="checkbox"/> YU ユーゴスラヴィア Yugoslavia   |
| <input type="checkbox"/> KE ケニア Kenya  | <input type="checkbox"/> ZA 南アフリカ共和国 South Africa                                       |
| <input type="checkbox"/> KG キルギス Kyrgyzstan  | <input type="checkbox"/> ZW ジンバブエ Zimbabwe  |
| <input type="checkbox"/> KP 北朝鮮 Democratic People's Republic of Korea              |   |
| <input type="checkbox"/> KR 韓国 Republic of Korea                                   |   |
| <input type="checkbox"/> KZ カザフスタン Kazakhstan                                      |   |
| <input type="checkbox"/> LC セント・ルシア Saint Lucia                                    |   |
| <input type="checkbox"/> LK スリ・ランカ Sri Lanka                                       |   |

下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締結国となった国を指定するためのものである

指定の確認の宣言：出願人は、上記の指定に加えて、規則 4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除く旨の表示を追記欄にした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。（指定の確認は、指定を特定する通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この確認は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。）



## 第VI欄 優先権主張

☐ 他の優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載している

先の出願日 (日、月、年)	先の出願番号	先の出願		
		国内出願：国名	広域出願：*広域官庁名	国際出願：受理官庁名
(1) 03.09.98	平成10年特許願 第249993号	日本国 JAPAN		
(2) 02.09.99	平成11年特許願 第248546号	日本国 JAPAN		
(3)				

☒ 上記( )の番号の先の出願（ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る）のうち、次の( )の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求している。

(1) (2)

\*先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない（規則4.10(b)(ii)）。追記欄を参照。

## 第VII欄 国際調査機関

国際調査機関（ISA）の選択

先の調査結果の利用請求：当該調査の照会（先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合）

出願日（日、月、年）

出願番号

国名（又は広域官庁）

ISA / JP

## 第VIII欄 照合欄：出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

願書 ..... 4 枚  
 明細書（配列表を除く）..... 87 枚  
 請求の範囲 ..... 6 枚  
 要約書 ..... 1 枚  
 図面 ..... 28 枚  
 明細書の配列表 ..... 62 枚  
 合計 ..... 188 枚

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

- ☒ 手数料計算用紙
  - ☒ 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面
  - ☒ 国際事務局の口座への振込みを証明する書面
  - ☐ 別個の記名押印された委任状
  - ☐ 包括委任状の写し
  - ☐ 記名押印（署名）の説明書
  - ☐ 優先権書類（上記第VI欄の( )の番号を記載する）
  - ☐ 国際出願の翻訳文（翻訳に使用した言語名を記載する）
  - ☐ 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面
  - ☒ スクレオチド又はアミノ酸配列表（フレキシブルディスク）
  - ☒ その他（書名を詳細に記載する）
- ・陳述書 ・優先権書類送付請求書  
 ・フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面

要約書とともに提示する図面：

本国際出願の使用言語名： 日本語

## 第IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。

佐 伯 憲 生



## 受理官庁記入欄

1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日

3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であって

その後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）

4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日

5. 出願人により特定された  
国際調査機関

ISA / JP

6. ☐ 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に  
調査用写しを送付していない

2. 図面

☐ 受理された☐ 不足図面がある

## 国際事務局記入欄

記録原本の受理の日

様式 PCT/RO/101 (最終用紙) (1998年7月：再版1999年7月)



P C T

手 数 料 計 算 用 紙

願 附 属 書

受理官庁記入欄

国際出願番号

出願人又は代理人の書類記号

J A 9 0 1 1 2 1

受理官庁の日付印

出願人

科学技術振興事業団

所定の手数料の計算

1. 及び 2. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律（国内法）  
第 1 8 条第 1 項第 1 号の規定による手数料（注 1）  
（送付手数料【T】及び調査手数料【S】の合計）

95,000 円 T+S

国際手数料（注 2）

基本手数料

国際出願に含まれる用紙の枚数 188 枚

最初の 3 0 枚まで

54,800 円 b 1

158 × 1,300 =

205,400 円 b 2

3 0 枚を越える用紙の枚数 用紙 1 枚の手数料

b 1 及び b 2 に記入した金額を加算し、合計額を B に記入

260,200 円 B

指定手数料

国際出願に含まれる指定数（注 3） 4

4 × 12,600 =

50,400 円 D

支払うべき指定手数料  
の数（上段は 1 0）  
（注 4）

1 指定当たりの手数料  
（円）

B 及び D に記入した金額を加算し、合計額を I に記入

310,600 円 I

4. 納付すべき手数料の合計

T+S 及び I に記入した金額を加算し、合計額を合計に記入

405,600 円

合 計

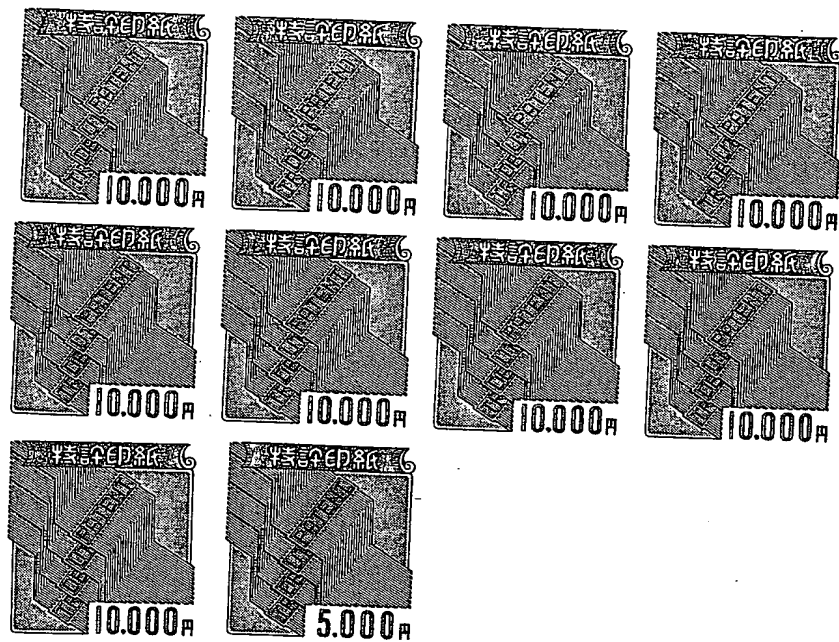
（注 1）送付手数料及び調査手数料については、合計金額を特許印紙をもって納付しなければならない。

（注 2）国際手数料については、受理官庁である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。

（注 3）願書第 V 欄でレ印を付した口の数。

（注 4）指定数を記入する。ただし、1 0 指定以上は一律 1 0 とする。





送付手数料・調査手数料 95,000円

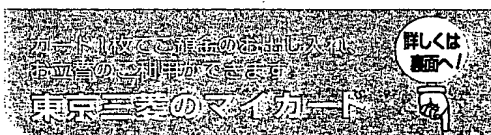




## ご利用明細

本日はご来店いただきありがとうございます。

年月日	時刻	取扱店番	銀行番号	支店番号	口座番号	印紙税申告納 付につき勤町 税務署承認済
110903	13.48	022				
お取引内容	お取引金額	お取扱い 否	残高	お取扱金額		
お振込	¥310,600*		おつり	¥138*	37	5千円 千円
ご案内				500円 100円 50円 10円 5円 1円		
お受取人 東京三菱銀行 内幸町支店 普通 0473286 WIPO-PCT GENEVA 様						
ご依頼人 タクミツキヨシムシヨ リエトノリオ 様 0352052521						
税込手数料 262円を いただきました						



- 残高欄の金額は決済未確定の証券類を含んでいます。
- 残高の頭部に「-」がある場合は、お借入れ残高を表わします。



基本手数料	260,200円
指定手数料	50,400円
合 計	310,600円



優先権書類送付請求書



特許庁長官 伊佐山 建志 殿

1. 国際出願の表示 03.09.99 提出の国際出願  
出願人又は代理人の書類記号 J A 9 0 1 1 2 1

2. 優先権の主張の基礎となる出願の表示

平成10年特許願第249993号

平成11年特許願第248546号

3. 出 願 人  
名 称

科学技術振興事業団

JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

あて名

〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町  
四丁目1番8号

1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama,  
332-0012 JAPAN

国 籍

日本国 J A P A N

住 所

日本国 J A P A N

4. 代 理 人  
氏 名

(10266) 弁理士 佐 伯 憲 生

SAEKI Norio

あて名

〒103-0027 日本国東京都中央区  
日本橋三丁目15番2号 高愛ビル 9階

9th Floor, Taka-ai Building, 15-2, Nihonbashi  
3-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

5. 添付書類の目録

平成10年特許願第249993号の優先権証明願 1 通

平成11年特許願第248546号の優先権証明願 1 通



優先権証明願 (P C T)



特許庁長官 伊佐山 建志 殿

1. 出願番号 平成10年特許願第249993号

2. 請求人

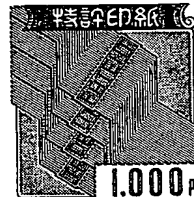
識別番号 10266

住所 〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号  
高愛ビル 9階

氏名 弁理士 佐 伯 憲 生

電話番号 03 (5205) 2521

3. 出願国名 P C T



(1, 500円)



優先権証明願 (P C T)



特許庁長官 伊佐山 建志 殿

1. 出願番号 平成11年特許願第248546号

2. 請求人

識別番号 10266

住所 〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号  
高愛ビル 9階

氏名 弁理士 佐伯 憲 生

電話番号 03 (5205) 2521

3. 出願国名 P C T



(1,500円)





陳述書

特許庁長官 伊佐山 健志 殿

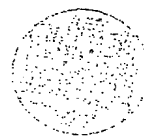
本書に添付したフレキシブルディスクに記録した塩基配列またはアミノ酸配列は、明細書に記載した塩基配列またはアミノ酸配列を忠実にコード化したものであって、内容を変更したものでないことを陳述します。

平成 11 年 09 月 03 日

国際出願の表示      03.09.99 提出の国際出願  
出願人又は代理人の書類番号      JA901121

発明の名称      中性アミノ酸トランスポーター及びその遺伝子

代理人      (10266) 弁理士      佐伯 憲生  
SAEKI Norio





フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面

1. 出願人名称      科学技術振興事業団  
Japan Science and Technology Corporation
2. 代理人氏名      佐伯 憲生  
SAEKI Norio
3. 国際出願の表示    03.09.99提出の国際出願  
出願人又は代理人の書類番号      J A 9 0 1 1 2 1
4. 発明の名称      中性アミノ酸トランスポーター及びその遺伝子
5. 使用した文字列コード      J I Sコード
6. 配列を記載したファイル名  
J A 9 0 1 1 2 1 . T X T
7. 連絡先  
電話番号      03(5205)2521  
担当者氏名      木下 真由美



# 特許協力条約

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

出願人代理人

佐伯 憲生

殿

あて名

〒103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9階 たくみ特許事務所

P C T



## 国際出願番号及び 国際出願日の通知書

（法施行規則第22条、第23条）  
〔PCT規則20.5(c)〕

PCT/JP99/04789

RO105

発送日（日．月．年）

14.09.99

出願人又は代理人  
の書類記号

JA901121

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP99/04789

国際出願日（日．月．年）

03.09.99

優先日（日．月．年）

03.09.98

出願人（氏名又は名称）

科学技術振興事業団

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、14日09月99年 に国際事務局に送付した。

### 注 意

- 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード（日本の場合JP）、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- この通知に記載された出願人のあて名、氏名（名称）に誤りがあるときは申出により訂正します。
- 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知（様式PCT/IB/301）する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名

日本国特許庁（RO/JP）

郵便番号 100-8915 TEL03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/105（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官



# 特許協力条約



P C T

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）

出願人代理人

佐伯 憲生

殿

あて名

〒103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9階 たくみ特許事務所

## 調査用写しの受理通知書

（法施行規則第39条）  
〔PCT規則25.1〕

PCT/JP99/04789

SA202

発送日（日．月．年）

14. 09. 99

出願人又は代理人

の書類記号

JA901121

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP99/04789

国際出願日（日．月．年）

03. 09. 99

優先日（日．月．年）

03. 09. 98

出願人（氏名又は名称）

科学技術振興事業団

1. 国際調査機関と受理官庁が同一の機関でない場合、

国際出願の調査用写しを国際調査機関が下記の日に受理したので通知する。

国際調査機関と受理官庁が同一の機関である場合、

国際出願の調査用写しを下記の日に受理したので通知する。

14 日 09 月 99 年（受理の日）

2. ☒ 調査用写しには、コンピューター読取りが可能な形式によるヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が添付されている。

3. 国際調査報告の作成期間

国際調査報告の作成期間は、上記受理の日から3箇月の期間又は優先日から9箇月の期間のいずれか遅く満了する期間である。

4. この通知書の写しは、国際事務局及び上記1の第1文が適用される場合には受理官庁に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（ISA/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/ISA/202（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官





# 特許協力条約



発信人 日本国特許庁（受理官庁）

P C T

出願人代理人

佐伯 憲生

殿

あて名

〒103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9階 たくみ特許事務所

## 手続補正命令書

（法第6条、法施第30条）

〔PCT3条（4）（i）14条（1）、規則26〕

PCT/JP99/04789

RO106

出願人又は代理人 の書類記号 JA901121		発送日（日．月．年） 14.09.99
国際出願番号 PCT/JP99/04789		応答期間 発送日から 1箇月以内
出願人（氏名又は名称） 科学技術振興事業団		国際出願日（日．月．年） 03.09.99

出願人は、上記期間内に手続きの補正をしなければならない。補正すべき事項は、次の附属書に記載されている。

☒ 附属書A

☐ 附属書B

☐ 附属書C

（注意）

### 補正の方法

手続補正書に補正事項を補正した差替え用紙を添付することにより行う。また、手続補正書の「補正内容」の欄に差替えられる用紙と差替え用紙との相違について記載する。なお、補正によって書き換えられる用紙の明瞭さ及び直接複製の可能性に悪影響を及ぼすことなく手続補正書の「補正内容」の欄から記録原本への書き換えが容易にできる場合には差替え用紙を省略することができる。

（PCT規則26.4（a）、法施行規則様式第15備考4参照）

### 注意

補正がされないときは、国際出願は取り下げられたものとみなす旨の決定がされる。

（法第7条第1項、PCT規則26.5参照）

この手続補正命令書の写し及び附属書の写しは、国際事務局

☐ 及び国際調査機関

に、送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（RO/JP）

郵便番号 100-8915 TEL03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/106（1998年7月）

権限のある職員

特許庁長官



国際出願について次の不備を発見した。

1. 願書の記名押印について

- a. ☐ 提出者の氏名又は名称の記載又は押印がない。
- b. ☐ 出願人全員の氏名又は名称の記載又は押印がない。
- c. ☐ 米国の出願人について、押印の欠如に関する説明書の添付がない。
- d. ☒ 代理人又は共通の代表者の氏名の記載及び押印はあるが、次の理由により認めることはできない。
  - ☒ 願書に代理人又は共通の代表者の選任を証明する書面の添付がない。
  - ☐ 願書に代理人又は共通の代表者の選任を証明する書面の添付があるが、次の出願人による代理人又は共通の代表者の選任を証明する書面の添付がない。
- e. ☐ その他

\* 発明者であっても出願人となる場合は、記名押印が必要である。(例：米国を指定した場合)

2. 願書の出願人に関する表示について

- a. ☐ 出願人の氏名又は名称が正しく記載されていない。
- b. ☐ 出願人のあて名が記載されていない。
- c. ☐ 出願人のあて名が正しく記載されていない。
- d. ☐ 出願人の国籍が記載されていない。
- e. ☐ 出願人の住所（居住者である国の国名）が記載されていない。
- f. ☐ その他

3. 国際出願の言語について

- a. ☐ 願書が日本語により作成されていない。
- b. ☐ 図面の説明の部分が日本語により作成されていない。
- c. ☐ 要約が日本語により作成されていない。

4. 発明の名称について

- a. ☐ 願書の第 I 欄に記載されていない。
- b. ☐ 明細書の最初の用紙の冒頭に記載されていない。
- c. ☐ 願書の第 I 欄に記載のものと、明細書の冒頭に記載のものが相違する。

5. 要約書について

- ☐ 国際出願に要約書が含まれていない。



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
 United States Patent and Trademark  
 Office  
 Box PCT  
 Washington, D.C.20231  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 26 April 2000 (26.04.00)	
<b>International application No.</b> PCT/JP99/04789	<b>Applicant's or agent's file reference</b> JA901121
<b>International filing date</b> (day/month/year) 03 September 1999 (03.09.99)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 03 September 1998 (03.09.98)
<b>Applicant</b> ENDOU, Hitoshi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:17 February 2000 (17.02.00)☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Sean Taylor Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

SAEKI, Norio  
Taka-ai Building  
9th floor  
15-2, Nihonbashi 3-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 103-0027  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 12 May 2000 (12.05.00)	
Applicant's or agent's file reference JA901121	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
International application No. PCT/JP99/04789	International filing date (day/month/year) 03 September 1999 (03.09.99)
International publication date (day/month/year) 16 March 2000 (16.03.00)	Priority date (day/month/year) 03 September 1998 (03.09.98)
Applicant  JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
03 Sept 1998 (03.09.98)	10/249993	JP	03 Janu 2000 (03.01.00)
02 Sept 1999 (02.09.99)	11/248546	JP	22 Octo 1999 (22.10.99)

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p>Shinji IGARASHI</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	---





EP



P C

## 特 許 協 力 条 約

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 JA901121	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04789	国際出願日 (日.月.年) 03.09.99	優先日 (日.月.年) 03.09.98
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C12N5/10, C07K14/47, C07K16/18,  
A61K48/00, A61K31/70, A61K39/395, C12Q1/02, A01N67/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C12N5/10, C07K14/47, C07K16/18,  
A61K48/00, A61K31/70, A61K39/395, C12Q1/02, A01N67/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),  
Genbank/DDBJ/EMBL/Geneseq, JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX 1	Prasad, D. P. et al. "Human LAT1, a Subunit of System L Amino Acid Transporter: Molecular Cloning and Transport Function" Biochem. Biophys. Res. Commun. (1999, Feb.) 第255巻 第2号 p. 283-288	1-55
PX 2	Tsurudome, M. et al. "Cutting Edge: Primary Structure of the Light Chain of Fusion Regulatory Protein-1/CD98/4F2 Predicts a Protein with Multiple Transmembrane Domains That Is Almost Identical to the Amino Acid Transporter E16" J. Immunol. (1999, Mar.) 第162巻 第5号 p. 2462-2466	1-55

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 11. 99

国際調査報告の発送日

30.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進



4N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

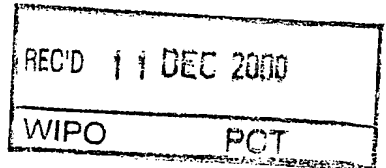


C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX 3	Mastroberardino, L. et al. "Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family" Nature (1998, Sep. 17) 第395巻 第6699号 p. 288-291	1-55
PX 4	Kanai, Y. et al. "Expression Cloning and Characterization of a Transporter for Large Neutral Amino Acids Activated by the Heavy Chain of 4F2 Antigen (CD98)" J. Biol. Chem. (1998, Sep. 11) 第273巻 第37号 p. 23629-23632	1-55
PX 5	Nakamura, E. et al. "4F2 (CD98) Heavy Chain is Associated Covalently with an Amino Acid Transporter and Controls Intracellular Trafficking and Membrane Topology of 4F2 Heterodimer" J. Biol. Chem. (1999, Feb) 第274巻 第5号 p. 3009-3016	1-55
X 6	Haynes, F. B. et al. "Characterization of a Monoclonal Antibody (4F2) that Binds to Human Monocytes and a Subset of Activated Lymphocytes" J. Immunol. (1981) 第128巻 第4号 p. 1409-1414	1-6, 20-27, 32-40
X 7	Hemler, E. M. et al. "Characterization of the Antigen Recognized by the Monoclonal Antibody (4F2): Different Molecular Forms on Human T and B Lymphoblastoid Cell Lines" J. Immunol. (1982) 第129巻 第2号 p. 623-628	1-6, 20-27, 32-40
A 8	Teixeira, S. et al. "Primary Structure of Human 4F2 Antigen Heavy Chain Predicts a Transmembrane Protein with a Cytoplasmic NH2 Terminus" J. Biol. Chem. (1987) 第262巻 第20号 p. 9574-9580	1-55
A 9	Lumadue, J. A. et al. "Cloning, sequence analysis, and expression of the large subunit of the human lymphocyte activation antigen 4F2" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 第84巻 第24号 p. 9204-9208	1-55
A 10	Quackenbush, E. et al. "Molecular Cloning of complementary DNAs Encoding the Heavy Chain of the Human 4F2 Cell-Surface Antigen: A Type II Membrane Glycoprotein Involved in Normal and Neoplastic Cell Growth" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 第84巻 第18号 p. 6526-6530	1-55
A 11	Broer, S. et al. "The 4F2hc surface antigen is necessary for expression of system L-like neutral amino acid-transport activity in C6-BU-1 rat glioma cells: evidence from expression studies in Xenopus laevis oocytes" Biochem. J. (1995) 第312巻 第3号 p. 863-870	1-55
A 12	Yao, S. Y. M. et al. "Cloning and Functional Expression of a cDNA from Rat Jejunal Epithelium Encoding a Protein (4F2hc) with System y <sup>+</sup> L Amino Acid Transport Activity" Biochem. J. (1998, Mar.) 第330巻 第2号 p. 745-752	1-55
A 13	Gaugitsch, H. W. et al. "A Novel Expressed, Integral Membrane Protein Linked to Cell Activation" J. Biol. Chem. (1992) 第267巻 第16号 p. 11267-11273	1-55



P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 JA901121	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P99/04789	国際出願日 (日.月.年) 03.09.99	優先日 (日.月.年) 03.09.98
国際特許分類 (IPC) C12N15/12, C12N5/10, C07K14/47, C07K16/18, Int. Cl <sup>7</sup> A61K48/00, A61K31/70, A61K39/395, C12Q1/02		
出願人 (氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 17.02.00	国際予備審査報告を作成した日 21.11.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)	4 N 9549
	引地 進 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	





## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-55

有

請求の範囲

無

進歩性(I S)

請求の範囲

1-55

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(I A)

請求の範囲

1-55

有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: J. Immunol. (1982) Vol. 129 No. 2 p. 623-628

文献2: J. Immunol. (1981) Vol. 126 No. 4 p. 1409-1414

請求の範囲 1-55

請求の範囲 1-55 記載の発明は、国際調査報告で引用された文献1及び2に対して新規性及び進歩性を有する。

文献1及び2には、モノクローナル抗体4F2が反応する細胞表面抗原蛋白質が記載されている。しかしながら、本願発明に係る蛋白質は、該4F2蛋白質を補助するアミノ酸輸送に関与する蛋白質であり、その点については、文献1及び2に記載されておらず、当業者にとって容易に想到し得るものでもない。



## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference JA901121	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/04789	International filing date (day/month/year) 03 September 1999 (03.09.99)	Priority date (day/month/year) 03 September 1998 (03.09.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12, 5/10, C07K 14/47, 16/18, A61K 48/00, 31/70, 39/395, C12Q 1/02		
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
- These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ ~~Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability~~
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 17 February 2000 (17.02.00)	Date of completion of this report 21 November 2000 (21.11.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04789

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04789

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-55	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-55	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-55	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Document 1: J. Immunol. (1982), Vol. 129, No. 2, pages 623-628

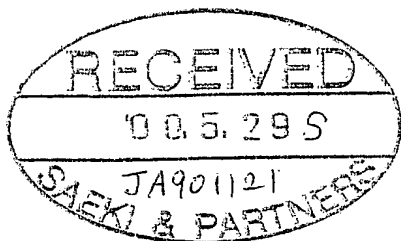
Document 2: J. Immunol. (1981), Vol. 126, No. 4, pages 1409-1414

#### Claims 1-55

The subject matters of claims 1-55 appear to be novel and to involve an inventive step in view of documents 1 and 2 cited in the ISR.

Documents 1 and 2 describe cell surface antigen proteins with which monoclonal antibody 4F2 reacts. However, the protein in the invention of the present application is a protein that participates in the amino acid transport assisting the 4F2 protein, and this matter is neither described in any of documents 1 and 2 nor could have been easily conceived by a person skilled in the art.





## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio  
Taka-ai Building  
9th floor  
15-2, Nihonbashi 3-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 103-0027  
JAPON

**NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 12 May 2000 (12.05.00)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference JA901121	
International application No. PCT/JP99/04789	
International publication date (day/month/year) 16 March 2000 (16.03.00)	
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al	International filing date (day/month/year) 03 September 1999 (03.09.99)  Priority date (day/month/year) 03 September 1998 (03.09.98)

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
03 Sept 1998 (03.09.98)	10/249993	JP	03 Janu 2000 (03.01.00)
02 Sept 1999 (02.09.99)	11/248546	JP	22 Octo 1999 (22.10.99)

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

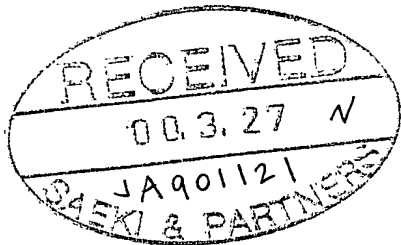
Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Shinji IGARASHI

Telephone No. (41-22) 338.83.38





## PATENT COOPERATION TREATY

WO 00/14228  
PCT/JP99/04789

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio  
Taka-ai Building  
9th floor  
15-2, Nihonbashi 3-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 103-0027  
JAPONNOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

Date of mailing (day/month/year) 16 March 2000 (16.03.00)		
Applicant's or agent's file reference JA901121		
<b>IMPORTANT NOTICE</b>		
International application No. PCT/JP99/04789	International filing date (day/month/year) 03 September 1999 (03.09.99)	Priority date (day/month/year) 03 September 1998 (03.09.98)
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU,EP,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

CA

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 16 March 2000 (16.03.00) under No. WO 00/14228

**REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)**

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

**REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))**

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38





## TENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED  
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio  
Taka-ai Building  
9th floor  
15-2, Nihonbashi 3-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 103-0027  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 26 April 2000 (26.04.00)		IMPORTANT INFORMATION	
Applicant's or agent's file reference JA901121			
International application No. PCT/JP99/04789	International filing date (day/month/year) 03 September 1999 (03.09.99)	Priority date (day/month/year) 03 September 1998 (03.09.98)	
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al			

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE  
National : AU,CA,US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

None

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" **before the expiration of 30 months from the priority date** before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>Sean Taylor</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	--





特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人  
佐伯 憲生

あて名  
〒 103-0027  
東京都中央区日本橋3丁目15番地2号  
高愛ビル9階 たくみ特許事務所

殿



PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

(法施行規則第57条)  
[PCT規則71.1]

発送日  
(日.月.年) 05.12.00

出願人又は代理人  
の書類記号 JA901121

重要な通知

国際出願番号  
PCT/JP99/04789

国際出願日  
(日.月.年) 03.09.99

優先日  
(日.月.年) 03.09.98

出願人（氏名又は名称）  
科学技術振興事業団

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。
3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。

4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第II巻を参照すること。

名称及びあて名  
日本国特許庁（IPEA/JP）  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員  
特 許 庁 長 官

4N 9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式PCT/IPEA/416（1992年7月）

（添付用紙の注意書きを参照）



## 注 意

### 1. 文献の写しの請求について

国際予備審査報告に記載された文献であって国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

(1) 特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

〔申込み及び照会先〕

〒100 東京都千代田区霞が関3-4-2 商工会館・弁理士会館ビル

財団法人 日本特許情報機構 サービス課

TEL 03-3503-3900

注) 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

### 2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）



## P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 JA901121	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P99/04789	国際出願日 (日.月.年) 03.09.99	優先日 (日.月.年) 03.09.98
国際特許分類 (IPC) C12N15/12, C12N5/10, C07K14/47, C07K16/18, Int. Cl <sup>7</sup> A61K48/00, A61K31/70, A61K39/395, C12Q1/02		
出願人 (氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT.36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - II ☐ 優先権
  - III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - IV ☐ 発明の単一性の欠如
  - V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - VI ☐ ある種の引用文献
  - VII ☐ 国際出願の不備
  - VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 17.02.00	国際予備審査報告を作成した日 21.11.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)  引地 進  電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 9549



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                     |         |        |                      |
|-------------------------------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)





## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-55

有

請求の範囲

無

進歩性(I S)

請求の範囲

1-55

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(I A)

請求の範囲

1-55

有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: J. Immunol. (1982) Vol. 129 No. 2 p. 623-628

文献2: J. Immunol. (1981) Vol. 126 No. 4 p. 1409-1414

請求の範囲1-55

請求の範囲1-55記載の発明は、国際調査報告で引用された文献1及び2に対して新規性及び進歩性を有する。

文献1及び2には、モノクローナル抗体4F2が反応する細胞表面抗原蛋白質が記載されている。しかしながら、本願発明に係る蛋白質は、該4F2蛋白質を補助するアミノ酸輸送に関与する蛋白質であり、その点については、文献1及び2に記載されておらず、当業者にとって容易に想到し得るものでもない。



特許協力条約に基づく国際出願  
国際予備審査請求書

第 II 章

出願人は、次の国際出願が特許協力条約に従って国際予備審査の対象とされることを請求し、  
選択資格のある全ての国を選択する。ただし、特段の表示がある場合を除く。



国際予備審査機関記入欄		
国際予備審査機関の確認	請求書の受理の日	
第 I 欄 国際出願の表示	出願人又は代理人の書類記号 JA901121	
国際出願番号 PCT/JP99/04789	国際出願日 (日. 月. 年) 03.09.99	優先日 (最先のもの) (日. 月. 年) 03.09.98
発明の名称 中性アミノ酸トランスポーター及びその遺伝子		
第 II 欄 出願人		
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 科学技術振興事業団 Japan Science and Technology Corporation 〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町4丁目1番8号 1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama-ken 332-0012 JAPAN		電話番号: 048-226-5619 ファクシミリ番号: 048-226-5652 加入電話番号:
国籍 (国名): 日本国 JAPAN	住所 (国名): 日本国 JAPAN	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 遠藤 仁 ENDOU Hitoshi 〒229-0022 日本国神奈川県相模原市由野台1-23-7 1-23-7, Yoshinodai, Sagamihara-shi, Kanagawa-ken 229-0022 JAPAN		
国籍 (国名): 日本国 JAPAN	住所 (国名): 日本国 JAPAN	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 金井 好克 KANAI Yoshikatsu 〒193-0932 日本国東京都八王子市緑町214-102 214-102, Midoricho, Hachioji-shi, Tokyo 193-0932 JAPAN		
国籍 (国名): 日本国 JAPAN	住所 (国名): 日本国 JAPAN	
<input type="checkbox"/> その他の出願人が続葉に記載されている。		



## 第Ⅲ欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

下記に記載された者は、☒ 代理人 又は ☐ 共通の代表者 として

☒ 既に選任された者であって、国際予備審査についても出願人を代理する者である。

☐ 今回新たに選任された者である。先に選任されていた代理人又は共通の代表者は解任された。

☐ 既に選任された代理人又は共通の代表者に加えて、特に国際予備審査機関に対する手続きのために、今回新たに選任された者である。

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

10266 弁理士 佐伯 憲生 SAEKI Norio

電話番号:

03-5205-2521

ファクシミリ番号:

03-5205-2522

加入電信番号:

〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号

高愛ビル 9階

9th floor, Taka-ai Building, 15-2, Nihonbashi 3-chome,

Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

## 第Ⅳ欄 国際予備審査に対する基本事項

補正に関する記述: \*

1. 出願人は、次のものを基礎として国際予備審査を開始することを希望する。

☒ 出願時の国際出願を基礎とすること。

☒ 明細書に関して

☒ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☒ 請求の範囲に関して

☒ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第19条の規定に基づいてなされた補正(添付した説明書も含む)を基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☒ 図面に関して

☒ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

2. ☐ 出願人は、特許協力条約第19条の規定に基づく請求の範囲に関する補正を差し替えることによって考慮されることを望む。

3. ☐ 出願人は、国際予備審査の開始が優先日から20月経過後まで延期されることを望む(ただし、国際予備審査機関が、特許協力条約第19条の規定に基づき行われた補正書の受領、又は当該補正を希望しない旨の出願人からの通知を受領した場合を除く(規則69.1(d))。)  
(この口は、特許協力条約第19条の規定に基づく期間が満了していない場合にのみ、レ印を付すことができる。)

\* 記入がない場合は、1)補正がないか又は国際予備審査機関が補正(原本又は写し)を受領していないときは、出願時の国際出願を基礎に予備審査が開始され、2)国際予備審査機関が、見解書又は予備審査報告書の作成開始前に補正(原本又は写し)を受領したときは、これらの補正を考慮して予備審査が開始又は続行される。

国際予備審査を行うための言語は 日本語 であり、

☒ 国際出願の提出時の言語である。

☐ 国際調査のために提出した翻訳文の言語である。

☐ 国際出願の公開の言語である。

☐ 国際予備審査の目的のために提出した翻訳文の言語である。

## 第Ⅴ欄 国の選択

出願人は、選択資格のある全ての指定国(即ち、既に出願人によって指定されており、かつ特許協力条約第Ⅱ章に拘束されている国)を選択する。

ただし、出願人は次の国の選択を希望しない。:



## 第VI欄 国際合欄

この国際予備審査請求書には、国際予備審査のために、第IVに記載する言語による書類が添付されている。

## 国際予備審査機関記入欄

受 領 未 受 領

- |  |   |                          |                          |
|--|---|--------------------------|--------------------------|
| 1. 国際出願の翻訳文                                    | 枚 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. 特許協力条約第34条の規定に基づく補正書                        | 枚 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. 特許協力条約第19条の規定に基づく補正書<br>(又は、要求された場合は翻訳文)の写し | 枚 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4. 特許協力条約第19条の規定に基づく説明書<br>(又は、要求された場合は翻訳文)の写し | 枚 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. 書簡  | 枚 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 6. その他 (書類名を具体的に記載する) :                        | 枚 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

この国際予備審査請求書には、さらに下記の書類が添付されている。

- |   |  |
|---|--|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙                  | 3. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を<br>貼付した書面 | 4. <input type="checkbox"/> 記名押印 (署名) に関する説明書              |
| <input checked="" type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込を証明する書面         | 5. <input type="checkbox"/> スクレイブド又はアミシク<br>(スクレイブド又はアミシク) |
| 2. <input type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状                       | 6. <input type="checkbox"/> その他 (書類名を具体的に記載する) :           |

## 第VII欄 提出者の記名押印

各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。

佐 伯 憲 生



## 国際予備審査機関記入欄

1. 国際予備審査請求書の実際の受理の日

2. 規則 60.1(b)の規定による国際予備審査請求書の受理の日の訂正後の日付

3. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理。ただし、以下の4. 5の項目にはあてはまらない。 ☐ 出願人に通知した。

4. ☐ 規則 80.5により延長が認められている優先日から19月の期間内の国際予備審査請求書の受理

5. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則82により認められる。

## 国際事務局記入欄

国際予備審査請求書の国際予備審査機関からの受領の日:





P C T

手 数 料 計 算 用 紙

国 際 予 備 審 査 請 求 書 の 附 属 書

国際予備審査機関記入欄

国際出願番号

P C T / J P 9 9 / 0 4 7 8 9

出願人又は代理人の書類記号

J A 9 0 1 1 2 1

国際予備審査機関の日付印

出願人

科学技術振興事業団

所定の手数料の計算

1. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律（国内法）  
第18条第1項第4号の規定による手数料  
（予備審査請求料）（注1）

2 8 , 0 0 0 円 P

2. 取扱手数料（注2）

1 6 , 5 0 0 円 H

3. 所定の手数料の合計

P及びHに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入

4 4 , 5 0 0 円

合 計

（注1）法第18条第1項第4号の規定による手数料については、特許印紙をもって納付しなければならない。

（注2）取扱手数料については、国際予備審査機関である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振り込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。

